

Quantitative Bildgebung der Niere im ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-  
Knockout Maus-Modell mittels Mikro- und Nano-  
Computertomographie

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hammer, Franziska Mechthild, geb. Scheiter  
aus Zschopau

Gießen 2018

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie  
Abteilung Diagnostische Radiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Leiterin: Prof. Dr. med. G. Krombach

Gutachter: Prof. Dr. med. A. C. Langheinrich

Gutachter: Prof. Dr. med. E. Baumgart-Vogt

Tag der Disputation: 18.04.2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 AUFBAU DER NIERE .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 NEPHRON .....	1
1.1.2 GEFÄßARCHITEKTUR.....	3
1.1.3 VERGLEICHENDE ANATOMIE DER NIERE VON MENSCH UND MAUS .....	4
<b>1.2 ATHEROSKLEROSE.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 PATHOGENESE.....	5
1.2.2 ATHEROSKLEROSE UND NIERENDYSFUNKTION .....	7
<b>1.3 BILDGEBUNG .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 COMPUTERTOMOGRAPHIE.....	9
1.3.2 GRUNDPRINZIP DER MIKRO-COMPUTERTOMOGRAPHIE .....	10
1.3.3 GRUNDPRINZIP DER NANO-COMPUTERTOMOGRAPHIE .....	15
<b>1.4 TIERMODELL .....</b>	<b>16</b>
<b>1.5 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT.....</b>	<b>17</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 TIERE UND TIERHALTUNG .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 KONTRASTMITTEL UND PERFUSIONSTECHNIK .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 BILDGEBUNG .....</b>	<b>19</b>
2.3.1 MIKRO-COMPUTERTOMOGRAPHIE .....	19
2.3.2 NANO-COMPUTERTOMOGRAPHIE.....	20
2.3.3 BILDANALYSE .....	20
<b>2.4 HISTOLOGIE.....</b>	<b>21</b>
2.4.1 FÄRBEMETHODEN.....	24
2.4.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN.....	24
<b>2.5 STATISTISCHE ANALYSE.....</b>	<b>26</b>
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 ATHEROSKLEROTISCHE LÄSIONEN.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 RENALE INFLAMMATION.....</b>	<b>28</b>

<b>3.3 QUANTITATIVE BILDANALYSE.....</b>	<b>31</b>
3.3.1 PARAMETER DER GLOMERULI.....	31
3.3.2 INTRARENALES GEFÄßVOLUMEN.....	36
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>39</b>
4.1 MIKRO-COMPUTERTOMOGRAPHIE .....	39
4.2 NANO-COMPUTERTOMOGRAPHIE .....	43
4.3 TIERMODELL .....	44
4.4 ATHEROSKLEROSE UND RENALE INFLAMMATION.....	49
4.5 LIMITATIONEN .....	51
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>52</b>
<b>6 SUMMARY.....</b>	<b>53</b>
<b>7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>8 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
8.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	IX
8.2 TABELLENVERZEICHNIS .....	X
<b>9 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>XI</b>
<b>10 PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>XXIV</b>
<b>11 ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION.....</b>	<b>XXV</b>
<b>12 DANKSAGUNG .....</b>	<b>XXVI</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Aufbau der Niere**

Das Nierenparenchym gliedert sich in zwei Anteile: Cortex renalis und Medulla renalis. Diese umschließen nach medial den Sinus renalis, welcher das in Fettgewebe eingebettete Nierenbecken und die Nierengefäße enthält.(Schiebler and Korf, 2007) Das Nierenmark besteht aus sieben bis neun kegelförmigen von Rindensubstanz umgebenen Pyramiden, deren Basis nach außen gerichtet ist. Von dieser ziehen sogenannte Markstrahlen in das angrenzende Rindengewebe, welche sich aus parallel verlaufenden Sammelrohren und geraden Tubulusabschnitten zusammensetzen. Die Spitze der Pyramide, Papilla renalis, ragt in das Nierenbecken. Die Papillen weisen an ihrer Oberfläche zahlreiche Öffnungen auf, durch die der Harn aus den Endstrecken der Sammelrohre, Ductus papillares, in das Nierenbecken gelangt.(Junqueira and Carneira, 2005)

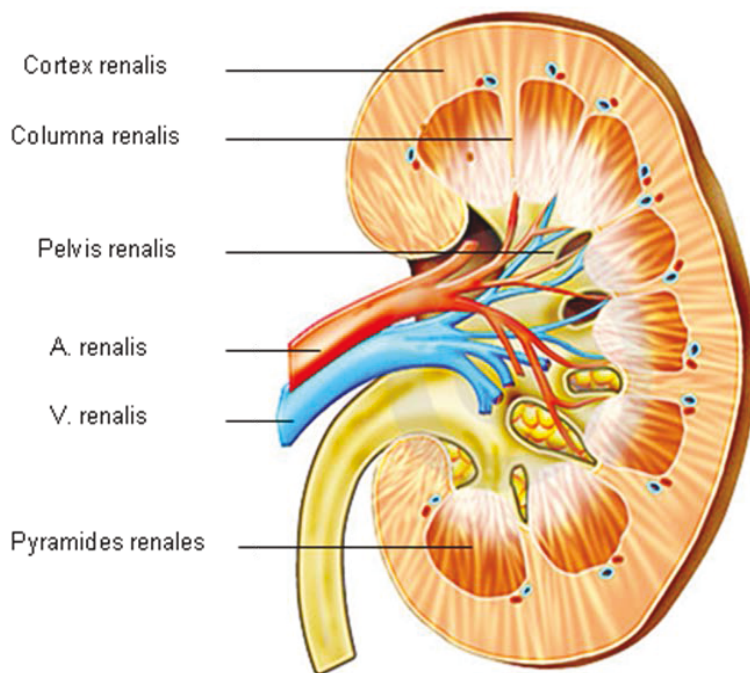
Die Nierenrinde stellt die unter der Kapsel gelegene Außenzone des Organs dar. Die zwischen den Markstrahlen gelegene Rindensubstanz wird Nierenlabyrinth genannt. Der Bereich des Rindengewebes, welcher die Markpyramiden seitlich umgibt, reicht bis an den Sinus renalis. Aufgrund des säulenförmigen Erscheinungsbildes in Längsschnitten der Niere bezeichnet man diese Abschnitte als Bertini-Säulen, Columnae renales (Abb.1).(Schiebler and Korf, 2007)

### **1.1.1 Nephron**

Die strukturelle und funktionelle Einheit der Niere wird als Nephron bezeichnet. Jedes Nephron setzt sich aus einem Nierenkörperchen und dem sich anschließenden Tubulussystem zusammen. Pro Niere finden sich ein bis anderthalb Millionen Nephrone.(Junqueira and Carneira, 2005)

Das in der Rindensubstanz gelegene Corpusculum renale weist einen Durchmesser von circa 200 µm auf und gliedert sich in die Bowmansche-Kapsel und das Glomerulum. Dieses aus 20 bis 40 anastomosierenden Kapillarschlingen bestehende Gefäßknäuel geht aus Verzweigungen des Vas afferens hervor und mündet in die Arteriola efferens.(Piper, 2007) Gemeinsam bilden die Arteriolen den Gefäßpol des

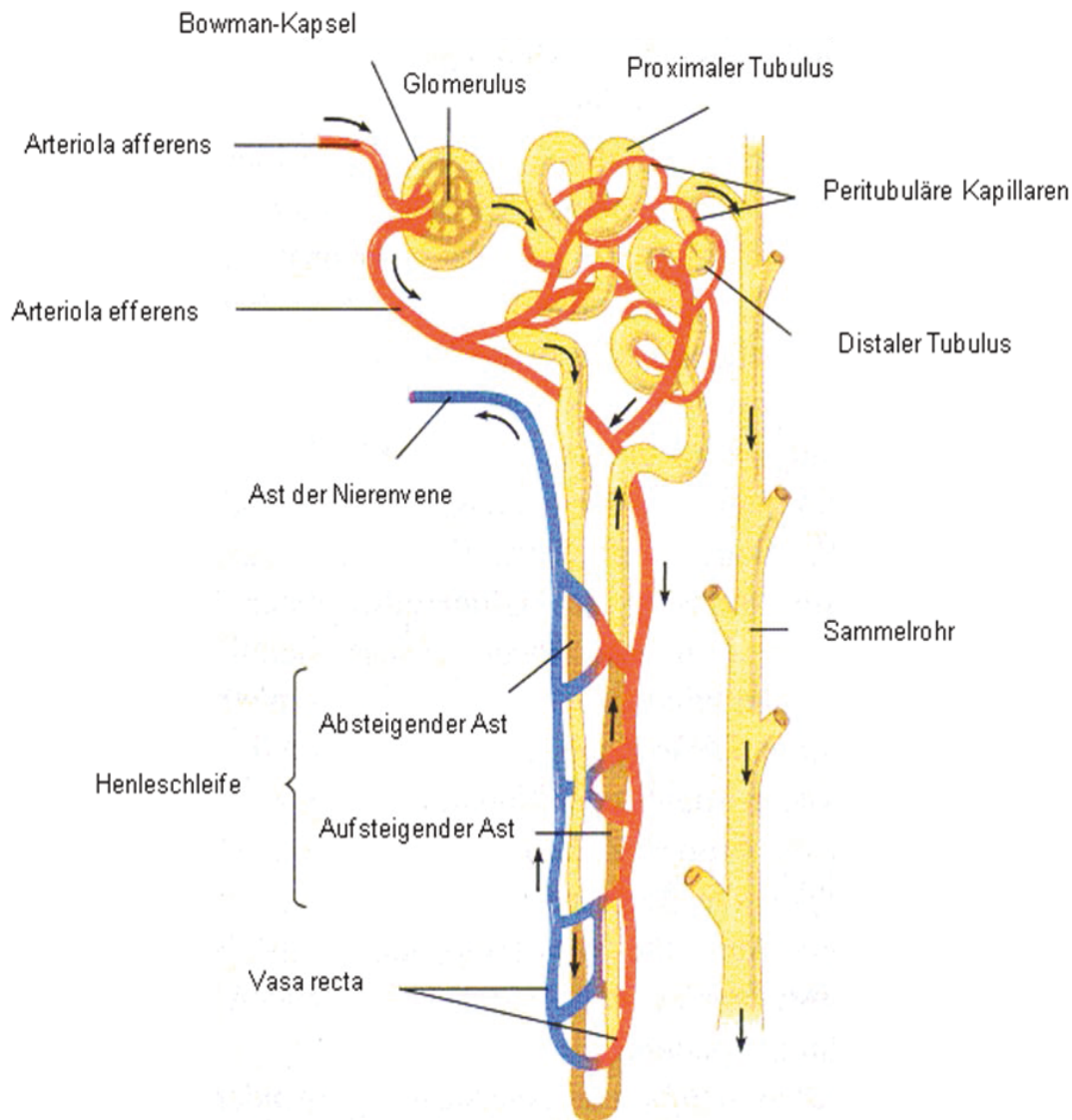
Nierenkörperchens. Die Bowmansche-Kapsel gliedert sich in das viszerale Blatt, welches dem Kapillarknäuel aufliegt sowie in das parietale Blatt, das die äußere



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des makroskopischen Aufbaus der Niere. (aus [www.dreamstime.com](http://www.dreamstime.com))**

---

Begrenzung des Corpusculum renale darstellt. Im Bereich des sogenannten Harnpols öffnet sich das parietale Blatt und geht in das Epithel des Tubulus über. Es schließt sich ein System aus morphologisch und funktionell unterschiedlichen Kanälchen an. (Schmidt and Lang, 2007) Zunächst gelangt der Primärharn in die Pars convoluta des proximalen Tubulus. Es folgen in Richtung des Harnflusses: die Henleschleife, Pars convoluta des distalen Tubulus, ein Verbindungstubulus und schließlich die Sammelrohre, welche insbesondere die Markregion kennzeichnen. Die Henleschleife setzt sich aus dem gestreckten Anteil des proximalen Tubulus, dem intermediären Tubulus und der Pars recta des distalen Tubulus zusammen (Abb. 2).



**Abbildung 2: Schematische Abbildung eines Nephrons mit Gefäßarchitektur.**  
(aus [www.staatsexamen.net](http://www.staatsexamen.net))

### **1.1.2 Gefäßarchitektur**

Die Blutversorgung der Niere erfolgt durch die aus der Aorta entspringende Arteria renalis. Diese teilt sich in einen Ramus anterior und einen Ramus posterior, bevor sie im Bereich des Hilus in die Niere eintritt. Optional kann zudem ein Ramus inferior existieren. (Benninghoff and Drenckhahn, 2008) Aus den Rami gehen Segmentarterien hervor, welche sich im Sinus renalis in die Aa. interlobares aufzweigen, die zwischen den Markpyramiden verlaufen. An der Basis der Pyramiden teilen sich die Interlobulararterien in die Aa. arcuatae, die entlang der Rinden-Mark-Grenze ziehen. Dabei finden sich weder zwischen den benachbarten Aa. interlobares noch zwischen

den Aa. arcuatae Anastomosen.(Welsch and Deller, 2010) Die Aa. arcuatae geben wiederum die Aa. interlobulares ab, welche senkrecht durch die Nierenrinde in Richtung Kapsel verlaufen. Von ihnen zweigt eine Vielzahl von Arteriolae afferentes zur Versorgung der Glomeruli ab. Aus den Kapillarknäueln der Nierenkörperchen entspringen schließlich die Arteriolae efferentes. Diese gehen im Bereich des Kortex in ein Kapillarnetz zur Versorgung des Tubulusepithels über. Aus den Arteriolae efferentes der juxtamedullären Glomeruli gehen sogenannte Vasa recta hervor. Sie verlaufen parallel zu den Henleschleifen und Sammelrohren sowohl in absteigender Richtung hin zur Papille als auch aufsteigend zur Mark-Rinden-Grenze. Die peritubulären Kapillaren ebenso wie die aufsteigenden Anteile der Vasa recta münden in die Vv. interlobulares. Dabei gelangen die Venulae rectae aus der Außenzone des Marks teilweise direkt in die Vv. arcuatae. Der sich anschließende venöse Abfluss der Niere verläuft parallel zu den Arterien (Vv. interlobulares, Vv. arcuatae, Vv. interlobares, Vv. segmentales, Vv. renales).(Junqueira and Carneira, 2005)

### ***1.1.3 Vergleichende Anatomie der Niere von Mensch und Maus***

Die menschliche Niere weist einen multipapillären Aufbau auf. Zunächst erfolgt die Anlage mehrerer „Einzelnieren“, Lobi renales.(Welsch and Deller, 2010) In der Regel besitzt der Mensch beidseits vierzehn dieser Untereinheiten, welche während der Embryonalentwicklung in unterschiedlichem Ausmaß zusammenwachsen. Am häufigsten kommt es durch diesen Prozess zur Bildung von Nieren, die über acht Papillen verfügen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Niere der Maus um einen unipapillären Aufbau.(Benninghoff and Drenckhahn, 2008) Die Unterteilung in Nierenrinde und Nierenmark ist jedoch bei beiden Spezies identisch. Auch die übrigen anatomischen Merkmale der Niere stimmen zwischen Mensch und Maus überein.

## **1.2 Atherosklerose**

Die Atherosklerose ist definiert als eine variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien, die aus einer fokalen Akkumulation von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, fibrösem Gewebe und Kalkablagerungen besteht und mit Mediaveränderungen einhergeht.(1958) Etwa 50% der Todesfälle von Erwachsenen im Alter von über 60 Jahren werden in der westlichen Welt durch die aus



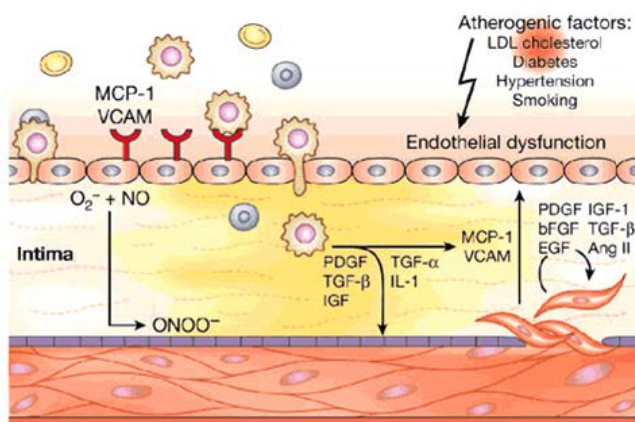
der Atherosklerose resultierenden Folgeerkrankungen wie Herz- und Zerebralinfarkt verursacht.(Gebbers, 2007)

### **1.2.1 Pathogenese**

Die Pathogenese der Atherosklerose stellt ein multifaktorielles Geschehen dar. Mittels Forschungsarbeiten über das Auftreten von atherosklerosebedingten Komplikationen wurden verschiedene Risikofaktoren eruiert, welche zur Entstehung und Progression der Gefäßwandveränderung beitragen. Zu diesen zählen Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie (Kannel *et al.*, 1961), männliches Geschlecht (Nieto, 1999), Alter und Nikotinabusus.(Dawber, 1960;Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group, 1990) Des Weiteren spielen genetische Faktoren, Adipositas (Kenchiah *et al.*, 2002), Hyperfibrinogenämie (Ridker *et al.*, 2001) und „Dys-Stress“ eine Rolle. Treten mehrere dieser Faktoren gleichzeitig auf, kommt es zur Potenzierung des Risikos für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen.(Brasen and Niendorf, 1997) Ebenso existieren gewisse Faktoren, die eine protektive Wirkung ausüben wie körperliche Betätigung, ein hoher HDL (high-density lipoprotein) -Spiegel sowie das Apolipoprotein A-I.(Falk, 2006)

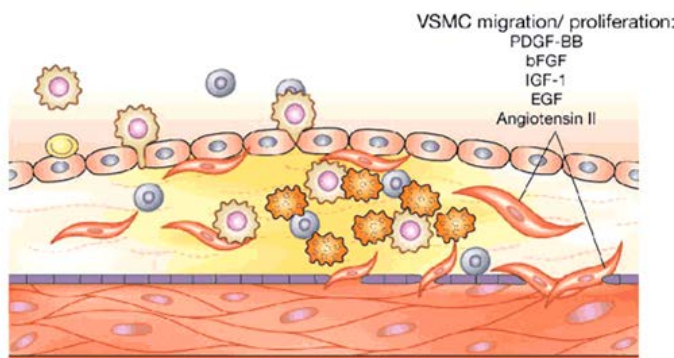
Die Atherogenese ist ein komplexer inflammatorischer Prozess, an dem humorale und zelluläre Faktoren beteiligt sind. Im Zentrum der „Response-to-injury-Hypothese“ von Ross steht die proliferative Reaktion der Gefäßwand als Antwort auf einen initialen Endothelzellschaden beziehungsweise eine endotheliale Dysfunktion.(Ross, 1993) Diese bedingt die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen sowie eine erhöhte Permeabilität des Endothels, wodurch das Einwandern von T-Lymphozyten und Monozyten in die Intima ermöglicht wird.(Ross, 1999;Hansson, 1993) Letztere transformieren zu cholesterinspeichernden Makrophagen und nehmen die low-density Lipoproteine (LDL) auf, welche sich subendothelial proportional zur Blutkonzentration anreichern. Die dadurch entstehenden Schaumzellen akkumulieren und bilden gemeinsam mit den T-Zellen sogenannte „fatty streaks“.(Hansson, 1993;Munro *et al.*, 1987) Diese Frühform der Atherosklerose kann sich bei Fortbestehen des die inflammatorische Reaktion auslösenden Agens über Zwischenstufen zu einem fibrösen Plaque entwickeln. Aufgebaut sind derartige Plaques aus proliferierten Mediamyozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und nekrotischen Zellresten sowie aus intra- und extrazellulären Lipiden. Die fibröse, den Plaque bedeckende Kappe besteht aus glatten Muskelzellen, welche von Kollagen, Elastin und Proteoglykanen umgeben sind. Sie dient dazu, eine Adhäsion der Thrombozyten an das proaggregatorische

Lipidmaterial zu verhindern. Kommt es jedoch zur Verarmung der fibrösen Kappe an extrazellulärer Matrix, besteht Rupturgefahr mit Freisetzung von thrombogenem Material und darauffolgender Okklusion des betroffenen Gefäßes. Die Stabilität einer solchen Läsion ist dabei vor allem abhängig von der Plaquezusammensetzung. (Kristensen *et al.*, 1999) Zur Ruptur neigende Plaques werden als vulnerable Plaques bezeichnet. (Little, 1990) Sie sind charakterisiert durch einen hohen Lipidanteil im Kern, eine verminderte Anzahl an glatten Muskelzellen der Media sowie eine ausgedünnte fibröse Kappe mit einem hohen Anteil an Makrophagen (Abb. 3). (Burke *et al.*, 1997; Falk *et al.*, 1995; Falk, 1992)



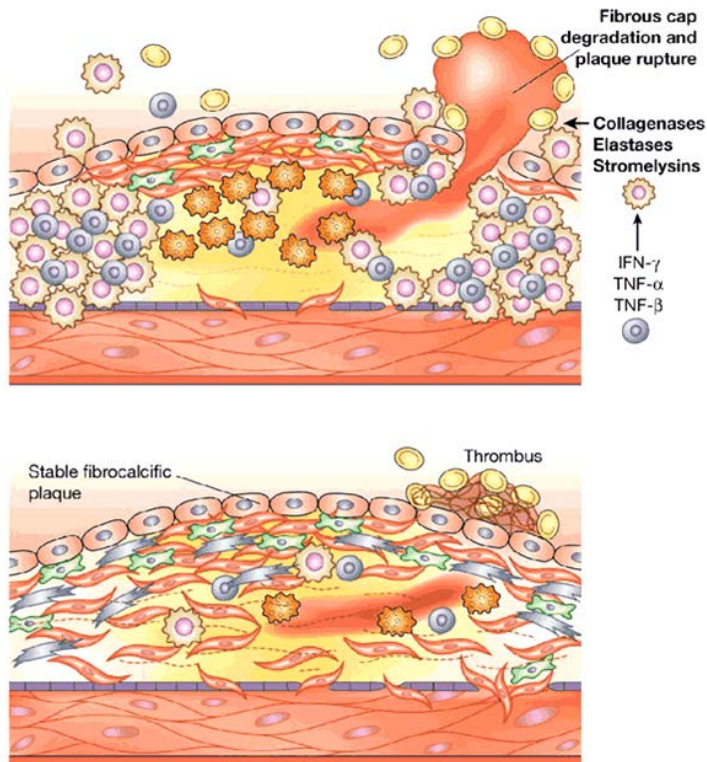
#### a) Initiierung der Atherosklerose

- Endotheliale Dysfunktion
- Einwanderung von Entzündungszellen
- Schaumzellen
- Aktivierung von glatten Muskelzellen (SMC)



#### b) Frühe Läsion

- Inflammation
- Schaumzellen mit „fatty streak“
- Proliferation und Migration von SMC



#### c) Vulnerable Läsion

- Atheromkern mit Schaumzellen
- Massive Inflammation an der Schulterregion
- Dünne fibröse Kappe mit Apoptose und Replikation der SMC
- Plaqueruptur

#### d) Fortgeschrittene Läsion

- Fibroblasten und Matrixbildung im Plaque
- Extrazelluläre Kalzifikation
- Massive Ansammlungen an SMC

**Abbildung 3: Pathogenese der Atherosklerose. (Dzau et al., 2002)**

### 1.2.2 Atherosklerose und Nierendysfunktion

Die chronische Inflammation von Gefäßen, wie sie im Rahmen der Atherosklerose auftritt, ist assoziiert mit renaler Dysfunktion. (Chade et al., 2005; Fassett et al., 2009) Die Prävalenz für das Auftreten von atherosklerotischen Läsionen bei Patienten mit chronischer Nierenkrankheit beträgt bis zu 30% (Amann et al., 2003) und ist unabhängig vom Vorhandensein klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren. (Bahous et al., 2009) Circa 50% der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz versterben an kardiovaskulären Ursachen. (Tonelli et al., 2006; Herzog et al., 1998) Auch Patienten mit milder bis moderater Niereninsuffizienz weisen bereits ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse auf. (Go et al., 2004; Dulau-Florea et al., 2003; Henry et al., 2002) Dabei existiert eine lineare Beziehung zwischen dem Ausmaß der Nierendysfunktion, gemessen an der Verminderung der glomerulären Filtrationsrate, und dem Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen. (Schiele, 2009)

Die pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen Nierenerkrankungen und kardiovaskulären Ereignissen sind äußerst komplex und bis heute noch nicht vollständig erforscht. Eine zentrale Rolle des zur Assoziation führenden Prozesses

spielt die endotheliale Dysfunktion.(Amann *et al.*, 2006;Schiffrin *et al.*, 2007) Zum einen stellt sie den initialen Mechanismus der Atherogenese dar, zum anderen ist sie bei renalen Erkrankungen präsent.(Endemann and Schiffrin, 2004) Patienten mit Nierendysfunktion weisen zudem häufig atherosklerotische Risikofaktoren auf, welche einen zusätzlichen Effekt auf die endotheliale Funktion ausüben. Zu nennen ist hier beispielsweise die Hypertonie, hervorgerufen durch Salzretention und Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems aufgrund der renalen Erkrankung. Des Weiteren findet sich bei der chronischen Nierenkrankheit oft eine Erhöhung von inflammatorischen Mediatoren und wie bereits erwähnt eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems mit der Folge von oxidativem Stress, welcher ebenfalls die Atherosklerose fördert.(Schiffrin *et al.*, 2007)

Weiterhin besteht eine Assoziation zwischen der chronischen Nierenkrankheit und spezifischen Störungen des Fettstoffwechsels.(Attman and Samuelsson, 2009;Trevisan *et al.*, 2006;Kaysen and Eiserich, 2004) Der Zusammenhang zwischen Dyslipidämie und chronischem Nierenversagen wurde erstmalig 1968 von Bagdade *et al.* beschrieben.(Bagdade *et al.*, 1968) Die Dyslipidämie beschleunigt dabei die Progression der glomerulären Dysfunktion und trägt außerdem bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz noch weiter zu dem bereits signifikant erhöhten kardiovaskulären Risiko bei. Lipidstoffwechselstörungen und Nephropathien scheinen sich gegenseitig sowohl in ihrer Entstehung als auch in ihrer Progression zu beeinflussen.

### **1.3 Bildgebung**

Verschiedene bildgebende Verfahren werden zur Diagnostik renaler Erkrankungen eingesetzt. Zu diesen gehören unter anderem die Sonographie (Mos *et al.*, 2010), die Magnetresonanztomographie (Schoth *et al.*, 2010) und die Computertomographie. Dabei kam es bis heute zu einer erheblichen Weiterentwicklung und Verbesserung der Aufnahmetechniken und Aufnahmemethoden. Beispielsweise erreichen Computertomographen heute sowohl wesentlich kürzere Scanzeiten als auch eine verringerte Strahlenbelastung. In experimentellen Studien kommen zudem Geräte mit einem noch höheren Auflösungsvermögen als das der klinischen CT-Scanner zum Einsatz. Zum Beispiel wurde unter Verwendung von Mikro-Computertomographen die dreidimensionale Gefäßstruktur der Niere beschrieben.(Garcia-Sanz *et al.*, 1998)

### **1.3.1 Computertomographie**

Mittels der konventionellen Röntgenbildgebung ist man in der Lage, dreidimensionale Körper auf einer Fläche abzubilden. Dabei werden jedoch alle im Strahlengang gelegenen Gewebestrukturen übereinander projiziert und als Summationsbild dargestellt. Im Gegensatz dazu ermöglicht die Computertomographie eine überlagerungsfreie Abbildung durch Anfertigung einzelner Schnittbilder, so genannter Tomogramme. 1971 erfolgten durch J. Ambrose und G.N. Hounsfield erste klinische Untersuchungen mit einem Computertomographen am Schädel einer Patientin.(Ambrose, 1973;Hounsfield, 1973) Bereits drei Jahre später wurde ein Ganzkörperscanner vorgestellt.(Beckmann, 2006) Mit Einführung der Spiraltechnik 1989 und der Verfügbarkeit von Mehrschichtsystemen folgte eine Entwicklung hin zum heute entscheidenden diagnostischen Verfahren der Radiologie.

Im Wesentlichen ist ein Computertomograph aus einem Patientenlagerungstisch, einem Bedienpult, dem Rechner und einer Gantry aufgebaut. Diese ringförmige Einheit setzt sich zusammen aus Strahlenquelle und Detektorsystem. Außerdem beinhaltet die Gantry einen Hochspannungsgenerator, ein Blenden- und ein Kühlsystem. Das Grundprinzip der Computertomographie besteht darin, die Abschwächung von Röntgenstrahlung nach dem transversalen Durchdringen eines Körpers mittels des Detektors zu erfassen.

Das Verfahren basiert auf 3 Komponenten, welche ebenso für die Mikro- und Nano-Computertomographie Gültigkeit besitzen:

- Akquisition
- Rekonstruktion
- Visualisierung und Quantifizierung.

Zur Bildakquisition werden aus verschiedenen Winkeln Projektionsbilder erzeugt. Der zuvor festgelegte Teil des Körpers wird während des Messvorgangs von dem vom Gerät ausgesandten Röntgenstrahlbündel abgetastet. Hierbei durchdringt ein schmaler fächerförmiger Röntgenstrahl die gewünschte Körperstelle und wird in seinem Verlauf bis zum gegenüberliegenden Detektor unterschiedlich stark abgeschwächt. Die Ursache dafür liegt in den Wechselwirkungen der Röntgenstrahlung mit den einzelnen Geweben (zum Beispiel Compton-Streuung und Photoeffekt). Dabei ist der Grad der Schwächung von verschiedenen Faktoren der Gewebe abhängig wie deren Dichte,

Atomzahl oder Schichtdicke. Beim Auftreffen der Röntgenstrahlen auf das Detektorsystem entstehen elektrische Signale, anhand derer Amplitude die lokale Abschwächung der Strahlung für alle Punkte des untersuchten Körpers bestimmt werden kann.

Im nächsten Schritt der Bildrekonstruktion wird jeder dieser Schwächungswerte mit Hilfe des hochleistungsfähigen Computers über komplexe mathematische Verfahren und Digitalisierung weiterverarbeitet. Pro Körperschicht entsteht ein Rekonstruktionsfeld beziehungsweise eine Matrix, die sich aus einzelnen Bildpunkten, so genannten Pixeln, mit einer gewissen Tiefe (d) zusammensetzt. Dabei bestimmt die Anzahl von Bildpunkten die Ortsauflösung. Das Produkt aus Pixel und Schichtdicke (d) repräsentiert das zu jedem Bildpunkt korrespondierende Volumenelement (Voxel). Abschließend wird den einzelnen Pixeln anhand des individuellen Schwächungswertes je ein Grauwert einer Skala zugeordnet, deren Graustufenanzahl und damit das Auflösungsvermögen zwischen den einzelnen Systemen variiert.

### **1.3.2 Grundprinzip der Mikro-Computertomographie**

Die Visualisierung und Quantifizierung von Strukturen einer Größenordnung  $< 200 \mu\text{m}$  erfolgte bisher unter Verwendung der Histomorphometrie. Diese Methode ermöglicht es jedoch nicht die dreidimensionale Mikroarchitektur einer Probe direkt wiederzugeben. Zudem werden lediglich kleine Ausschnitte beziehungsweise wenige Mikrometer des Untersuchungsobjektes zur Quantifizierung herangezogen. Dadurch können fehlerhafte Werte entstehen. Das Herauslösen des zu analysierenden Gewebesegments aus der Gesamtheit bedeutet auch, dass die Probe im Anschluss nicht für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung steht.

Als alternatives, gewebeerhaltendes Verfahren zur quantitativen Histologie hat sich die Mikro-Computertomographie in der Ex-vivo-Forschung etabliert.(Jorgensen *et al.*, 1998) Sie ermöglicht es, Strukturen in ihrer dreidimensionalen Komplexität zu erfassen und ihre intakte Kontinuität beizubehalten.(Rueggsegger *et al.*, 1996) Bereits in den frühen achtziger Jahren wurden Mikro-Computertomographen, welche Röntgenstrahlung aus modifizierten Mikrofokusröntgenröhren emittierten, eingesetzt.(Elliott and Dover, 1982;Sato *et al.*, 1981;Burstein *et al.*, 1984) Primär fand das Verfahren in der Osteoporose-Forschung zur Morphometrie spongiösen Knochens Anwendung.(Engelke *et al.*, 1999;Kapadia *et al.*, 1998) Inzwischen kommt die Mikro-Computertomographie in vielen Bereichen zum Einsatz. Beispielsweise wurden auf

dem Gebiet der vaskulären Grundlagenforschung neue Erkenntnisse über pathologische Gefäßveränderungen gewonnen.(Simopoulos *et al.*, 2001;Maehara, 2003;Fortepiani *et al.*, 2003)

Mit Einführung der Mikro-Computertomographie konnte mittels des von Feldkamp entwickelten Rekonstruktionsalgorithmus eine höhere Ortsauflösung (30-50  $\mu\text{m}$ ) erzielt werden, als dies bei klinischen CT-Scannern bisher möglich gewesen war.(Feldkamp, 1984) Darauffolgend wurden 1987 Mikro-Computertomographen vorgestellt, welche Synchrotronstrahlung als Strahlungsquelle verwendeten und ein Auflösungsvermögen von 10  $\mu\text{m}$  erreichten.(Flannery *et al.*, 1987) Synchrotronstrahlung wird mit Hilfe von Teilchenbeschleunigern in Form von Elektronenspeicherringen erzeugt und ist wesentlich hochenergetischer als herkömmliche Röntgenstrahlung.

Ein Mikro-Computertomograph weist grundsätzlich drei Bestandteile auf: eine Strahlenquelle, einen Probenschlitten und eine CCD-Detektorkamera (Charged-Coupled-Device) verbunden mit einem Computersystem zur Verarbeitung der Datensätze.(Ritman, 2004) Das Untersuchungsobjekt dreht sich auf dem Probenschlitten in einem festgelegten Strahlengang zwischen der Mikrofokusröntgenröhre und dem Detektor. Im Gegensatz dazu rotiert in klinischen CT-Scannern die Gantry um den Patienten. Ein weiterer Unterschied zwischen Mikro-Computertomographen und im klinischen Alltag eingesetzten CT-Scannern besteht in der resultierenden Ortsauflösung (Tabelle 1). Diese kann durch die Mikro-CT-Technologie um ein bis zwei Größenordnungen gesteigert werden (von 1-0,5 mm auf 5-50  $\mu\text{m}$ ). Dafür sind sehr kleine Fokusgrößen von 5-30  $\mu\text{m}$  notwendig. Eine Reduktion der Fokusgrößen wird durch Verwendung von Fein- und Mikrofokusröntgenröhren mit Transmissions- oder Reflektionsanoden erreicht. Alternativ werden Synchrotronstrahlungsquellen eingesetzt.

Die Geometrie des Mikro-CT-Scanners, das heißt der Strahlenverlauf, wird durch die Wahl der Röntgenquelle festgelegt: Im Falle von Mikrofokusröntgenröhren ergibt sich eine Fächer- oder Kegelstrahlgeometrie. Bei Verwendung von Synchrotronstrahlung nutzt man die Parallelstrahlgeometrie. Hierbei ist die maximal zu erzielende Auflösung hauptsächlich abhängig vom Auflösungsvermögen des verwendeten Detektors. Bei der Fächer- oder Kegelstrahlgeometrie ist die Fokusgröße ausschlaggebend für die maximal erreichbare Auflösung (Abb. 4 und Abb. 5).

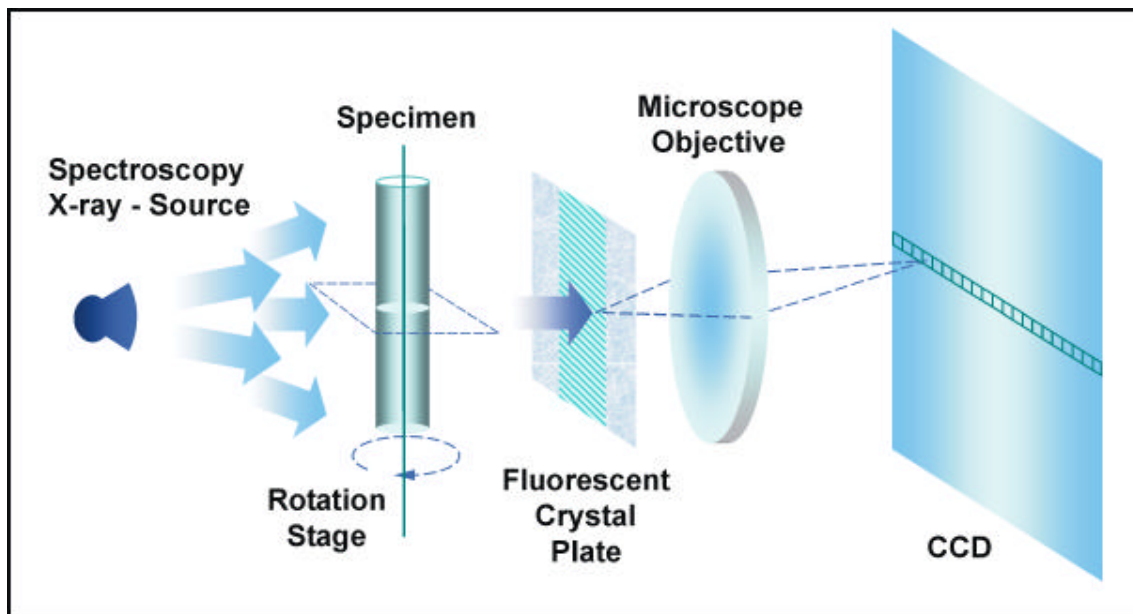


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Mikro-CT-Scanners mit Kegelstrahlgeometrie. (Erik L Ritman; Mayo Clinic; Rochester, USA)

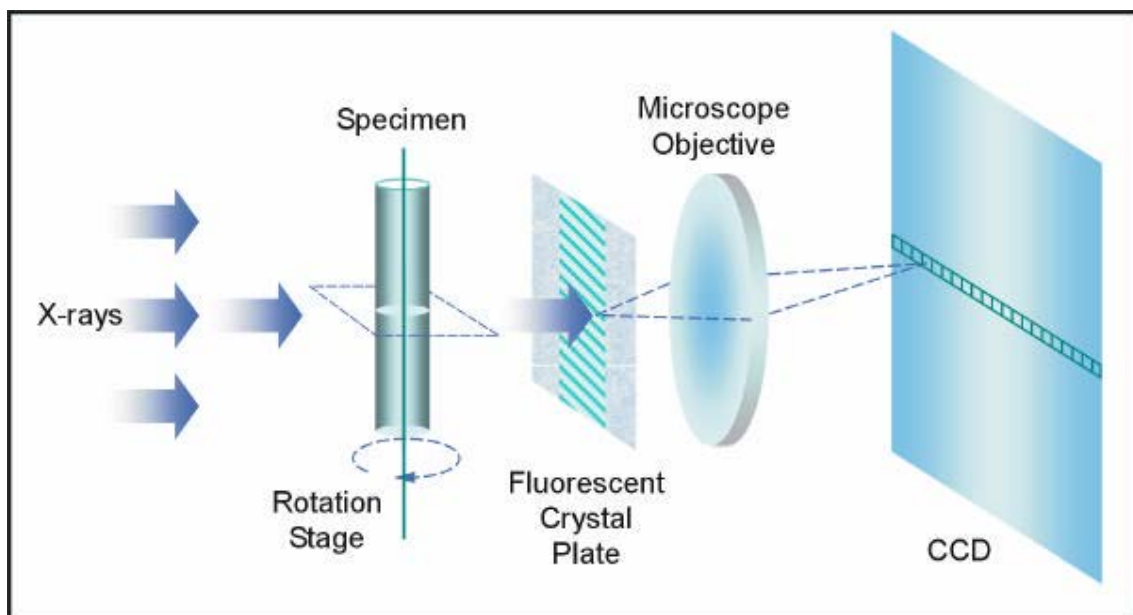


Abbildung 5: Parallelstrahlgeometrie bei Synchrotronstrahlungsquelle. (Erik L Ritman; Mayo Clinic; Rochester, USA)



Fein- und Mikrofokusröntgenröhren arbeiten vorwiegend bei Stromstärken von 40-100  $\mu\text{A}$  und Spannungen von 10-150 kV. Die Anzahl von Röntgenquanten pro Fläche innerhalb eines Zeitintervalls wird als Intensität der Strahlung bezeichnet und wird durch die Leistung der Röhre vorgegeben. Die Bildauflösung ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Eine Erhöhung wird durch einen möglichst kleinen Fokus sowie eine hohe Strahlungsintensität erreicht. Eine Reduktion der Fokusgröße hat jedoch eine Verringerung der Röhrenleistung zur Folge. Eine parallele Intensitätssteigerung und Fokusverminderung ist demnach ausgeschlossen. Für eine dennoch hohe Bildauflösung bedient sich die Mikro-Computertomographie zweier Lösungen. Zum einen ergibt sich eine wesentlich längere Scann-Dauer von Minuten bis Stunden zum anderen nutzt man geringe Probendurchmesser. Da zwischen der Größe der Probe und der Auflösung ein Zusammenhang über einen Faktor von 1000 besteht, ist beispielsweise bei einer Auflösung von 10  $\mu\text{m}$  die Probengröße auf ca. 1 cm begrenzt.(Engelke *et al.*, 1999)

Das zu untersuchende Objekt wird auf dem Probenträger positioniert. Dieser ist auf einer drehbaren Achse angebracht, so dass er in frei definierbaren Winkelschritten rotieren kann. Dabei wird die Position der Probe von einer optischen Kamera überwacht. Der Probenschlitten ist des Weiteren in seiner Längsachse zwischen Strahlenquelle und Detektor verschiebbar. Somit kann durch Veränderung des Abstands von Untersuchungsobjekt und CCD-Detektor die geometrische Vergrößerung des Projektionsbilds beeinflusst werden. Je nach Position der Probe variiert der Vergrößerungsmaßstab zwischen 1:1 und 20:1. Theoretisch wäre es möglich, durch dichtes Heranführen des Objektes an die Strahlungsquelle eine noch höhere Vergrößerung zu erzielen. Praktisch wird dies jedoch durch die Brennfleckgröße begrenzt. Die geometrische Vergrößerung ist definiert als das Verhältnis zwischen Strahlenquelle-Detektor-Abstand zu Strahlenquelle-Objekt-Abstand. Mit zunehmender Annäherung der Probe an die Strahlenquelle und damit gleichzeitiger Vergrößerung des Projektionsbilds wird dieses jedoch dementsprechend unscharf. Außerdem sollte die Breite des Projektionsbildes nicht die der CCD-Detektorfläche überschreiten, da dies zu Artefakten in der Bildberechnung führen kann.(Langheinrich *et al.*, 2004a)

Als Bilddetektor dient eine etwa 25  $\mu\text{m}$  dicke Szintillatorschicht, welche einem faseroptischen Sensor aufliegt und an eine 12-bit CCD-Kamera gekoppelt ist. Letztere wird elektronisch gekühlt. Die Kühlung dient vor allem bei langen Messzeiten dazu, einem Ansteigen des Dunkelstroms entgegenzuwirken, wodurch ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erzielt wird.(Engelke *et al.*, 1999) Die Kamera (Matrix 1024 x 1024 Pixel) ermöglicht einen maximalen Bildausschnitt (field of view, FOV) von 25 mm und

ist mit einem digitalen Frame-Grabber verbunden. Die von der Röntgenquelle emittierte Strahlung durchleuchtet das zu untersuchende Objekt und trifft anschließend auf die aus Caesiumiodid und Thallium [CsI(Tl)] bestehende Szintillatorschicht. Dort erfolgt die Umwandlung in Lichtsignale mit anschließender Übertragung an die Oberfläche der CCD-Kamera mit Hilfe der faseroptischen Systeme. Der Frame-Grabber ist mit Computersystemen zur Bildvisualisierung verbunden und dient der Konvertierung der analogen Lichtsignale in digitale Signale. Diese werden als Absorptionsbilder an die angeschlossenen Arbeitsstationen weitergeleitet. Dort erfolgt die Bildrekonstruktion aus den Rohdaten unter Anwendung des Feldkamp-Algorithmus.(Feldkamp, 1984) Mittels dieser Rückprojektionstechnik entstehen isotrope axiale Schnittbilder, welche eine ungefähre Größe von 1 MB aufweisen. Aus diesen axialen Einzelschichtbildern entsteht die Rekonstruktion des gesamten dreidimensionalen Objekts. Für jedes einzelne Schnittbild wird die Grauwertverteilung optimiert, indem der minimale und maximale Grauwert festgelegt wird. Daran schließt sich die serielle Rekonstruktion der Schnittbilder der kompletten Probe an. Mit Hilfe eines Bildanalyseprogramms, z.B. Analyze® 6.0 (Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA), erfolgt die Visualisierung sowie die qualitative und quantitative Auswertung der Probe.

	<b>Ganzkörper-Spiral-CT</b>	<b>Mikro-CT</b>
<b>Geometrie</b>	Fächerstrahl  Detektor und Röhre rotieren	Fächer- oder Kegelstrahl  Objekt rotiert
<b>Maximale Ortsauflösung</b>		
in der Schicht	0,25 – 1,0 mm	5 – 50 µm
Schichtdicke	0,50 -2,0 mm	5 – 50 µm
<b>Röhre</b>	Hochleistungs-CT-Röhre	Fein- oder Mikrofokusröhre
Strom	10 – 500 mA	40 – 100 µA
Spannung	80 – 140 kV	10 – 150 kV
Fokusgröße	0,7 – 1,5 mm	5 – 30 µm
<b>Detektor</b>	Zeilendetektor	Zeilen- oder Flächendetektor
<b>Objektdurchmesser</b>	5-50 cm	< 5 cm
<b>Matrixgröße</b>	512 <sup>2</sup>	512 <sup>3</sup> - 1024 <sup>3</sup>
<b>Volumenscanzeiten</b>	10 – 40 s (Thorax)	Minuten bis Stunden

**Tabelle 1: Charakteristische Merkmale eines Ganzkörper-Spiral-CT-Scanners im Vergleich mit einem Mikro-Computertomographen. (modifiziert nach Engelke et al. Der Radiologe. 1999(Engelke et al., 1999))**

### **1.3.3 Grundprinzip der Nano-Computertomographie**

Durch die Entwicklung von Nano-Computertomographen ist man heute in der Lage, Auflösungen im Submikrometer-Bereich zu erzielen. Zuvor war dies ausschließlich mit der vergleichsweise aufwendigen und kostenintensiven Synchrotron-Technik möglich. Mittels der Nano-CT-Scanner kann die Mikrostruktur einer Probe zerstörungsfrei analysiert und dreidimensional dargestellt werden. Verwendung findet dieses Verfahren derzeit vor allem in der biomedizinischen Forschung. Weitere Einsatzgebiete sind die Materialwissenschaft, um Stoffe zu charakterisieren, und die Elektronikindustrie zur Untersuchung elektronischer Bauteile.(Cnudde et al., 2006;Roth, 2006) Erstmals wurde ein labortauglicher Nano-CT-Scanner im Jahr 2005 von der belgischen Firma SkyScan vorgestellt.

Der Grundaufbau eines Nano-Computertomographen, bestehend aus den Elementen Strahlenemitter, Probenschlitten und Strahlendetektor, ist prinzipiell mit dem eines Mikro-CT-Gerätes vergleichbar. Der ausschlaggebende Unterschied liegt in der wesentlich höheren Ortsauflösung, die unter Verwendung der Nano-CT-Technologie erzielt werden kann. Hierbei wird der Brennfleck der Mikrofokusröntgenröhre mit Hilfe eines mehrstufigen Linsen- und Blendensystems bis auf wenige Mikrometer konzentriert. Die Röntgenröhre entspricht einer Strahlenquelle vom offenen Typ, welche mit speziellen Vakuumpumpen verbunden ist, die den kontinuierlichen Abtransport von Luft gewährleisten. Dieser ist erforderlich, um zu verhindern, dass die von der Kathode emittierten Elektronen durch Luft oder andere Gase gestoppt werden. Mittels einer Röhrenspannung zwischen 20 und 80 kV wird der Elektronenstrahl beschleunigt und trifft auf das sogenannte Target. Dieses besteht bei Transmissionsröhren aus einer extrem dünnen Wolframbeschichtung auf der Oberfläche einer Leichtmetallplatte (Beryllium). Beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf das Target kommt es zur Emission von Röntgenstrahlung, die durch das Berylliumfenster, welches die Grenze zwischen Vakuum und Luft darstellt, austritt. Anschließend wird die zu untersuchende Probe durchstrahlt, die zwischen Röntgenröhre und Detektor rotiert. Mit Hilfe von diesem werden die Röntgenstrahlen zunächst in Lichtsignale und anschließend in digitale Signale überführt. Nach der Rekonstruktion der Datensätze dient ein Bildanalyseprogramm, z.B. Analyze® 6.0 (Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA), der Visualisierung und Auswertung der Proben sowie ihrer Parameter.

Die Nano-CT-Technologie ermöglicht es Fokusgrößen von unter 400 nm zu erreichen. Dies stellt eine Überlegenheit gegenüber der Mikro-Computertomographie dar, bei der die Fokusgrößen zwischen 5 – 30 µm liegen.

## 1.4 Tiermodell

Die Maus als Tiermodell bietet die besten Voraussetzungen für Studien genetisch bedingter Krankheiten. Zum einen ist die Zucht unkompliziert und die Generationsdauer kurz, zum anderen besteht die Möglichkeit, sogenannte Inzuchtlinien zu untersuchen. (Breslow, 1993) Allerdings weist die Maus eine hohe Resistenz gegenüber der Atherosklerose auf. (Jawien *et al.*, 2004) Zunächst verwendete man deshalb spezielle Diäten, um atherosklerotische Läsionen zu erzeugen, später kamen transgene Techniken zum Einsatz. Auf diesem Weg wurde das ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-

Knockout Maus-Modell entwickelt, welches ein bewährtes, international anerkanntes Modell in der Atheroskleroseforschung darstellt. Es bietet die Möglichkeit, den Einfluss von endogenen und exogenen Faktoren auf die Entstehung und die Beschaffenheit atherosklerotischer Läsionen zu untersuchen.(Jawien *et al.*, 2004;Reddick *et al.*, 1994) Die Tiere entwickeln eine hochgradige Hyperlipidämie sowie atherosklerotische Plaques (Ishibashi *et al.*, 1994;Bonthu *et al.*, 1997) und weisen dabei bedeutende strukturelle Ähnlichkeiten zur humanen Atherosklerose auf.(Langheinrich and Bohle, 2005)

## **1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Visualisierung und Quantifizierung von Nierenstrukturparametern im ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Maus-Modell mittels hochauflösender Mikro- und Nano-CT Bildgebung.

Aufgrund der bekannten systemischen Atherosklerose in diesem Tiermodell sollen vaskuläre Parameter in den Nieren von ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäusen erfasst werden. Die quantitative Analytik mittels hochauflösender Bildgebung soll in der Histologie korreliert werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tiere und Tierhaltung**

Die Tierversuche wurden nach Genehmigung des Versuchsvorhabens durch das Regierungspräsidium Gießen am 22.02.2008 (Gz.: V54-19c20-15 (GI20/9; Nr. 76/2007)) nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (BGBl. I S. 3294, in der Fassung vom 21.12.2006) durchgeführt.

Wir untersuchten sechs männliche, atherosklerosesensible ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse (Charles Rivers Wiga, Sulzfeld, Deutschland). Als Kontrolle dienten männliche C57/BL Mäuse (n=5). Die Haltung der Tiere erfolgte in der SPF-Anlage (Specific Pathogen-Free Facility) des Zentralen Tierstalles der Universitätsklinik Gießen unter Wahrung der homozygoten Linie. Die Mäuse wurden in jeweils individuell belüfteten Käfigen gehalten. Die Anzahl der Tiere pro Käfig lag bei maximal fünf. Es herrschte eine Umgebungstemperatur von 22,5°C, die Käfigtemperatur betrug 23°C. Es wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus mit einer Belichtungsdauer von 12 Stunden aufrechterhalten.

Den Versuchstieren wurde ein Basisfutter, Zuchtfutter 2019 Harlan-Winkelmann, in Form von sterilen Pellets verabreicht. Diese Standarddiät besteht aus 19,64 % Rohprotein und 8,35 % Rohfett. Die sich ergebende umsetzbare Energie der Diät beträgt 3600 Kcal/kg (14,98 MJ/kg). Sowohl Futter als auch Wasser standen den Mäusen jederzeit frei zur Verfügung.

### **2.2 Kontrastmittel und Perfusionstechnik**

Die Tiere wurden im Alter von achtzig Wochen mittels Isofluran getötet. Nach Eröffnung des Situs wurde der linke Ventrikel punktiert und es erfolgte die Injektion von heparinierter Kochsalzlösung (1000 IE/100 ml NaCl 0,9%). Simultan wurde die Vena cava inferior eröffnet. Die Spülung des Gefäßsystems erfolgte bis der venöse Abstrom makroskopisch blutleer erschien. Anschließend wurde über die Kanüle Microfil (Microfil MV 122, Flow Tech, Carver, MA, USA) mit einem Druck von 100 mmHg appliziert. Das röntgendichte Kontrastmittel setzt sich aus den drei Komponenten MV Compound, MV Diluent und MV Curring Agent zusammen. Diese werden in einem Verhältnis von

1:1:0,1 miteinander vermischt. Eine ausreichende Perfusion zeigt sich anhand einer Gelbfärbung der Organe. Nach 20 Minuten härtet das Polymer aus. Die entstehende gummiartige Konsistenz bewirkt eine gute Stabilität und Haftung an den Gefäßwänden, sodass die Gefäße in ihrer Form fixiert werden.

Abschließend wurden die Nieren in toto entnommen und bis zur Untersuchung in 4%iger Formalinlösung fixiert.

## **2.3 Bildgebung**

### **2.3.1 Mikro-Computertomographie**

Der Mikro-Computertomograph (Mikro-CT\_1072) der Firma SkyScan® (Kontich, Belgien) verfügt über eine Mikrofokusröntgenröhre als Strahlenquelle mit einer Fokusgröße von 8 µm und nutzt die Fächerstrahlgeometrie. Das Gerät kann bei einer Beschleunigungsspannung bis 80 kV bei einer Leistung von 8 W betrieben werden. Der Detektor des Mikro-Computertomographen besteht aus einer wassergekühlten CCD-Kamera in Verbindung mit einer ca. 25 µm dicken Szintillatorschicht. Eine maximale geometrische Vergrößerung von etwa 80 kann erreicht werden. Diese wird durch die relative Position der Probe zur Strahlenquelle und dem Abstand des Detektors zur Strahlenquelle bestimmt.

Um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern, werden die Präparate vor dem Scannen in Parafilm®-Folie verpackt. Anschließend werden sie auf dem drehbaren Probenschlitten zwischen Mikrofokusröntgenröhre und CCD-Kamera platziert. Elektronisch gesteuert rotiert der Probenschlitten 180° um die eigene vertikale Achse in definierten Winkelschritten von 0,45°. Die Belichtungszeit bzw. Expositionszeit pro Rotationsschritt beträgt 2,4 s. Hierbei entstehen pro Rotationswinkelschritt Absorptionbilder bei einer Aquisitionsmatrix von 1024 x 1024 Pixel. Unter Verwendung der Rückprojektionstechnik werden diese in isotrope, axiale Schnittbilder umgewandelt. Mit Hilfe des modifizierten Feldkamp-Fächerstrahl-Algorithmus werden die virtuellen Schnittbilder berechnet. Die Datensätze werden unter Nutzung eines dualen Intel®Xeon™ Prozessors (2x1800MHz, 1024 MB RAM) zu dreidimensionalen Strukturen mit 8-bit Grauwertverteilung rekonstruiert, wobei die maximal erreichbare Endgröße der kubischen Voxel 12 µm beträgt. Hierfür wird in etwa eine Zeitdauer von 6 Stunden benötigt.

### **2.3.2 Nano-Computertomographie**

Um weiterführende Informationen über die Anatomie der Mikrogefäße der Nieren zu erhalten, wurden die Proben im Anschluss an die Mikro-Computertomographie ebenfalls im Nano-Computertomographen (Nano-CT\_2011, Firma SkyScan®, Kontich, Belgien) untersucht.

Das uns zur Verfügung stehende Gerät nutzt eine Mikrofokusröntgenröhre als Strahlenquelle, welche mittels einer LaB<sub>6</sub>-Kathode einen Elektronenstrahl emittiert. Dieser wird unter Verwendung zweier elektromagnetischer Linsen gebündelt und auf die Oberfläche der Anode fokussiert. Durch das Auftreffen der Elektronen auf das aus einer wolframbeschichteten Berylliumglasplatte bestehende Target entsteht Röntgenstrahlung mit einer Fokusgröße von unter 400 nm. Nach dem Durchtritt durch das Berylliumfenster durchwandert die Röntgenstrahlung in Fächerstrahlgeometrie das Untersuchungsobjekt, welches sich zwischen Strahlenquelle und Röntgendetektor auf einem computergesteuerten Probenhalter dreht. Der an einen Bildverstärker und eine Szintillatorschicht gekoppelte Röntgendetektor besteht aus einer digitalen, hochauflösenden 12-bit CCD-Kamera (Matrix 1280 x 1024 Pixel). Diese wird mittels Wasser gekühlt und weist eine 3,7:1 Faseroptik auf.

Nachdem unsere Proben in Parafilm®-Folie verpackt wurden, platzierten wir sie auf dem Probenhalter. Bei einer Röhrenspannung von 40 kV rotierten sie während des Scanvorgangs in Schritten von 0,25° insgesamt 180° um die eigene vertikale Achse. Die Rekonstruktion der hierbei gewonnenen Rohdaten erfolgte mittels des modifizierten Feldkamp-Algorithmus. Es resultierten dreidimensionale Bilder mit 12-bit Grauwertverteilung und einer Voxelgröße von 900 nm.

### **2.3.3 Bildanalyse**

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit dem Programm Analyze® 6.0 (Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA). Mit Hilfe dieser Software können dreidimensionale Volumenbilder erstellt und quantifiziert werden. Wir bestimmten zunächst das Gesamtvolumen der renalen Gefäße (Total Vascular Volume = TVV, mm<sup>3</sup>). Von diesem wurde anschließend der arterielle und der venöse vaskuläre Volumenanteil (mm<sup>3</sup>) ermittelt.



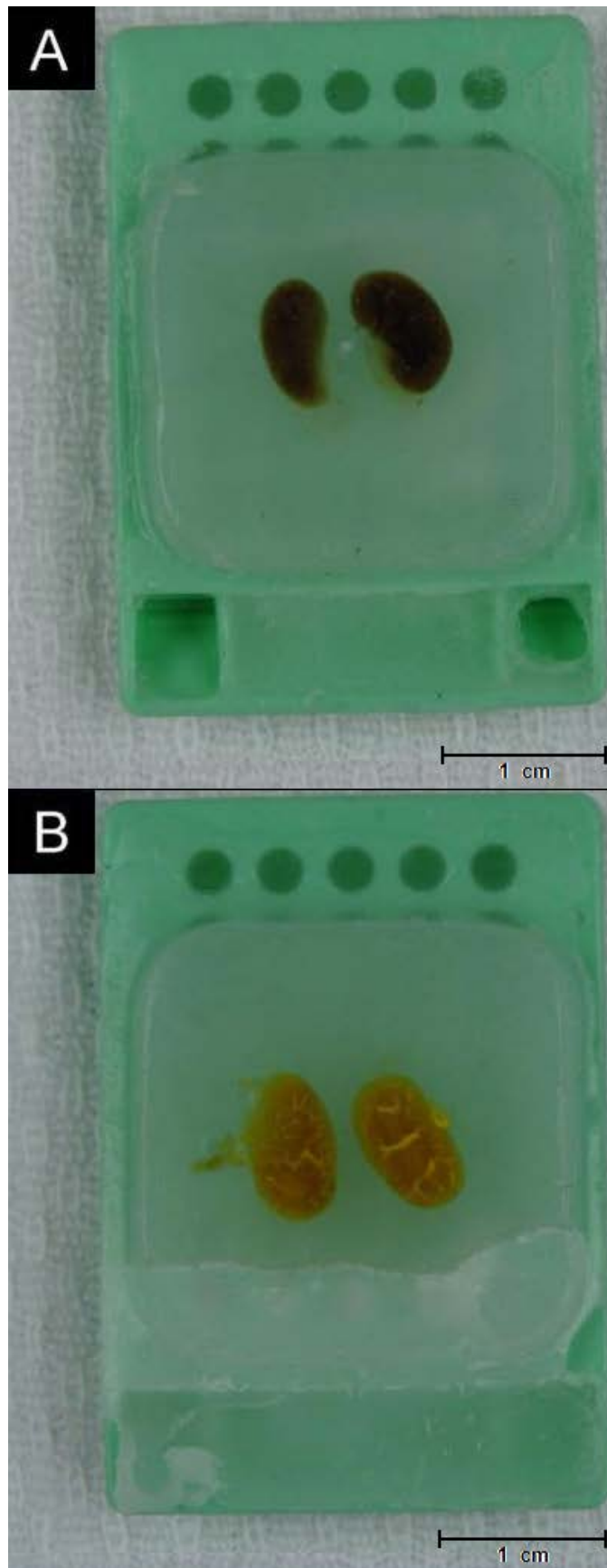
## 2.4 Histologie

Nachdem die Proben mittels der bildgebenden Verfahren untersucht wurden, erfolgte die histologische Aufarbeitung und Auswertung im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen.

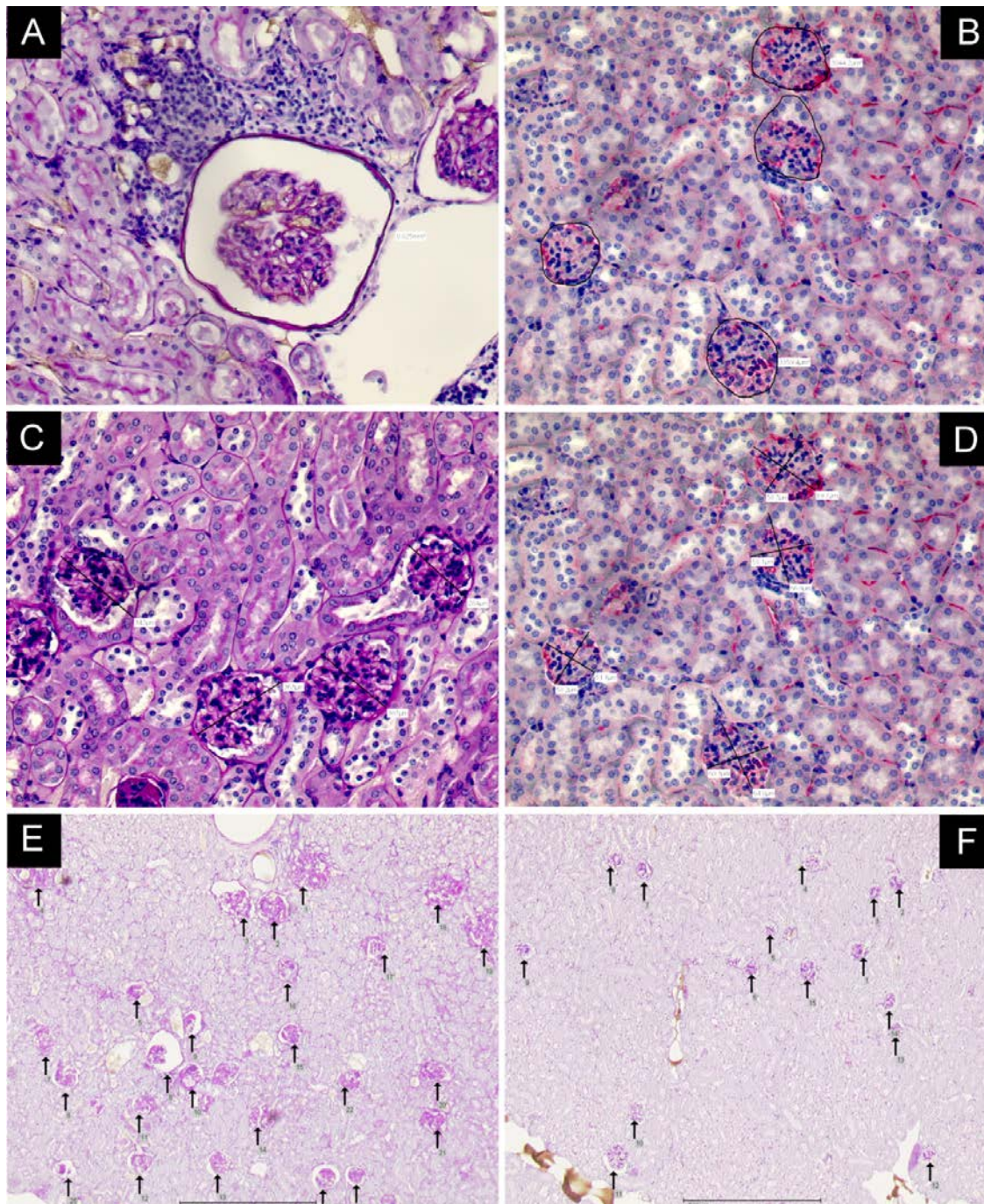
Die Proben wurden in Paraffinwachs eingebettet (Abb. 6). Dafür platzierten wir sie zunächst in einem Einbettkasten und entwässerten sie anschließend mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe. Das entwässerte Gewebe wurde mit heißem, flüssigem Paraffin durchtränkt. Nach dem Erkalten ermöglicht es die Konsistenz des Paraffins, sehr dünne und gleichmäßige Gewebeschnitte herzustellen. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden Präparate von 6  $\mu\text{m}$  Dicke zugeschnitten. Diese wurden in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 36-38°C gestreckt und auf einen Objektträger aufgezogen. Da Färbelösungen nicht in Paraffin eindringen können, folgte dem Trocknen der Präparate das Herauslösen des Paraffins aus dem Gewebe mittels Xylol. Daraufhin wurden die Schnitte in absteigender Alkoholreihe gewässert und abschließend mittels verschiedener Methoden eingefärbt.

Unter Verwendung eines Lichtmikroskops und der darin integrierten JVC Digital Camera wurden die histologischen Präparate quantifiziert und digitalisiert (Abb. 7). Dabei bestimmten wir die folgenden Parameter:

- Gesamtanzahl der Glomeruli pro Schnittfläche
- Anteil der pathologisch veränderten Glomeruli pro Schnittfläche
- Durchmesser der Kapillaren innerhalb des Glomerulums ( $\mu\text{m}$ )
- Fläche ( $\mu\text{m}^2$ ) der Glomeruli.



**Abbildung 6: Makroskopische Aufnahmen der Nieren einer C57/BL Maus (A) und einer ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Maus (B) nach Perfusion mittels Microfil und Einbettung in Paraffin.**



**Abbildung 7: Quantifizierung der histologischen Schnitte der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse (A, C, E) und der Kontrolltiere (B, D, F). Wir ermittelten die Fläche (A, B, PAS-Färbung), den Durchmesser (C, D, PAS-Färbung) und die Gesamtanzahl (E, F, HE-Färbung) der Glomeruli pro Schnittfläche.**

### **2.4.1 Färbemethoden**

Die von uns verwendete Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) gilt in der Histologie als Routinefärbung, die einen Überblick über die Struktur des Gewebes liefert. Durch das enthaltene Hämatoxylin stellen sich alle basophilen Komponenten, wie die Kerne, blauschwarz bis violett dar. Eosin färbt im Gegensatz dazu alle eosinophilen Strukturen, zum Beispiel das Zytoplasma, rosa bis rot. Außerdem wurden unsere Schnitte mit der PAS-Reaktion (Periodic acid-Schiff) angefärbt. Bei dieser werden insbesondere kohlenhydrathaltige Strukturen, wie die Basalmembran, nachgewiesen, welche sich magenta-rot verfärben.

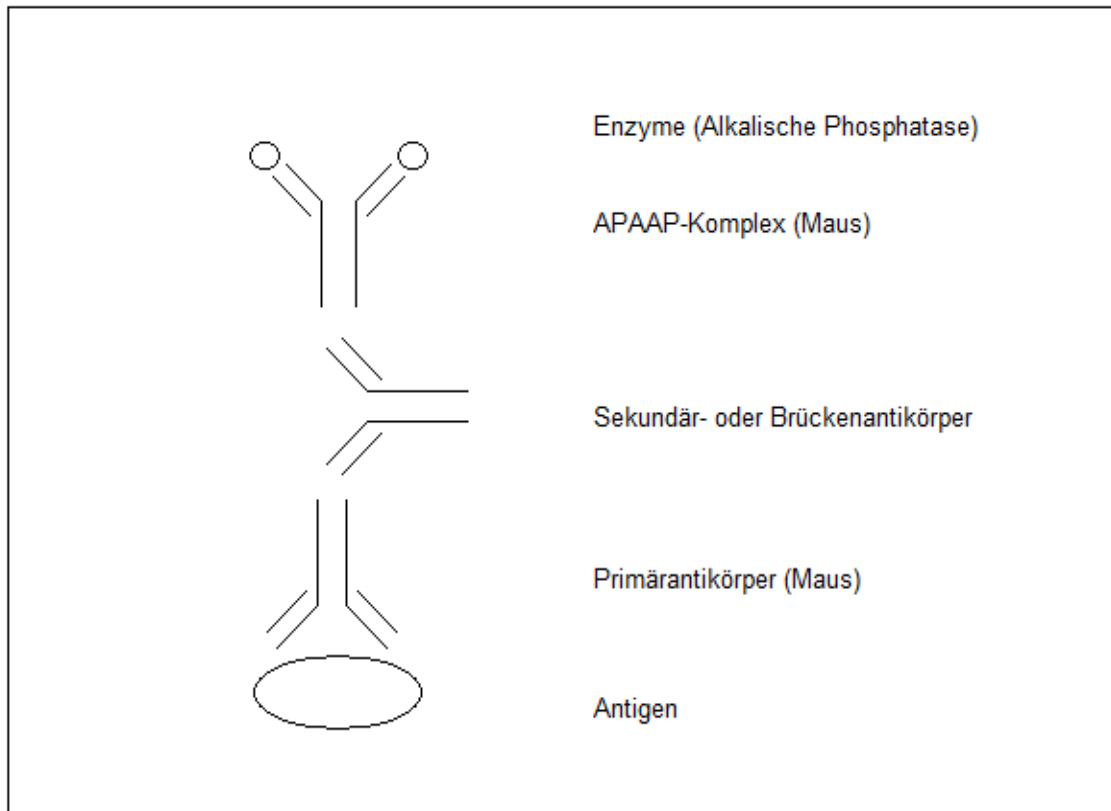
### **2.4.2 Immunhistochemische Färbungen**

Zusätzlich zur HE- und PAS-Färbung führten wir bei den Nieren der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse eine immunhistochemische Färbung durch. Das Prinzip dieser Nachweismethode basiert auf Antigen-Antikörper-Reaktionen. Hierbei binden markierte Immunglobuline an zelluläre Gewebeantigene, wodurch diese sichtbar werden. Die Antikörper sollten eine hohe Spezifität und Affinität aufweisen und keine Kreuzreaktion zu ähnlichen Epitopen zeigen.

Unsere Schnitte wurden mittels der APAAP-Methode (Cordell *et al.*, 1984) (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) eingefärbt. Für dieses indirekte Nachweisverfahren werden insgesamt drei Antikörper benötigt (Abb. 8):

- Ein monoklonaler aus der Maus stammender Primärantikörper, welcher das nachzuweisende Antigen erkennt und bindet.
- Ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper, der als Brücken- oder Sekundärantikörper bezeichnet wird und sowohl gegen das Fc-Fragment des Primär- als auch gegen die Fc-Region des dritten benötigten Antikörpers gerichtet ist.
- Dieser ist ein monoklonaler Maus-anti-alkalische-Phosphatase-Antikörper, welcher zwei Moleküle intestinale alkalische Phosphatase (vom Kalb) binden kann. Der so entstehende Enzym-Antikörper-Komplex wird mit Naphthol-As-Biphosphat versetzt, welches dem Enzym als Substrat dient. Das Hinzufügen

eines Chromogens (Neufuchsin) zum Spaltprodukt bewirkt schließlich einen roten Niederschlag.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der APAAP-Methode.**

Die von uns verwendeten Antikörper richten sich gegen die an einer inflammatorischen Reaktion beteiligten Zellen. Die immunhistochemische Detektion von Plasmazellen erfolgte mittels CD138 Antikörpern. Zum Nachweis von B-Lymphozyten wurden Färbungen mit CD20 Antikörpern durchgeführt. T-Lymphozyten wurden anhand von CD3 Oberflächenantigenen und der entsprechenden Antikörper charakterisiert. Des Weiteren setzten wir einen Antikörper ein, welcher sich gegen Faktor VIII-assoziiertes Antigen (VIII-RAG) richtet. Dieses wird von Endothelzellen synthetisiert und markiert vaskuläre Strukturen. Der Anti-FVIII-RAG Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:12000 verwendet.

Für unsere Untersuchungen nutzten wir Reagenzien des DAKO TechMate system (Glostrup, Dänemark).



## 2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der erfassten Daten wurde mit Hilfe des JMP-Statistikprogramms (JMP, A Business, Unit of SAS; SAS Campus Drive, Cary, NC 27513; Version JMP Release 6.0) durchgeführt.

Alle Ergebnisse der deskriptiven Statistik in den Texten und Bildern wurden als Mittelwertvergleiche  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SEM) angegeben. Die Daten über das renale vaskuläre Volumen sowie über die Anzahl und Größe der Glomeruli wurden mit dem einfaktoriellen Varianzanalysentest (One-way ANOVA) und dem unpaaren t-Test ausgewertet. Die statistische Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde in allen Berechnungen als signifikant erachtet.

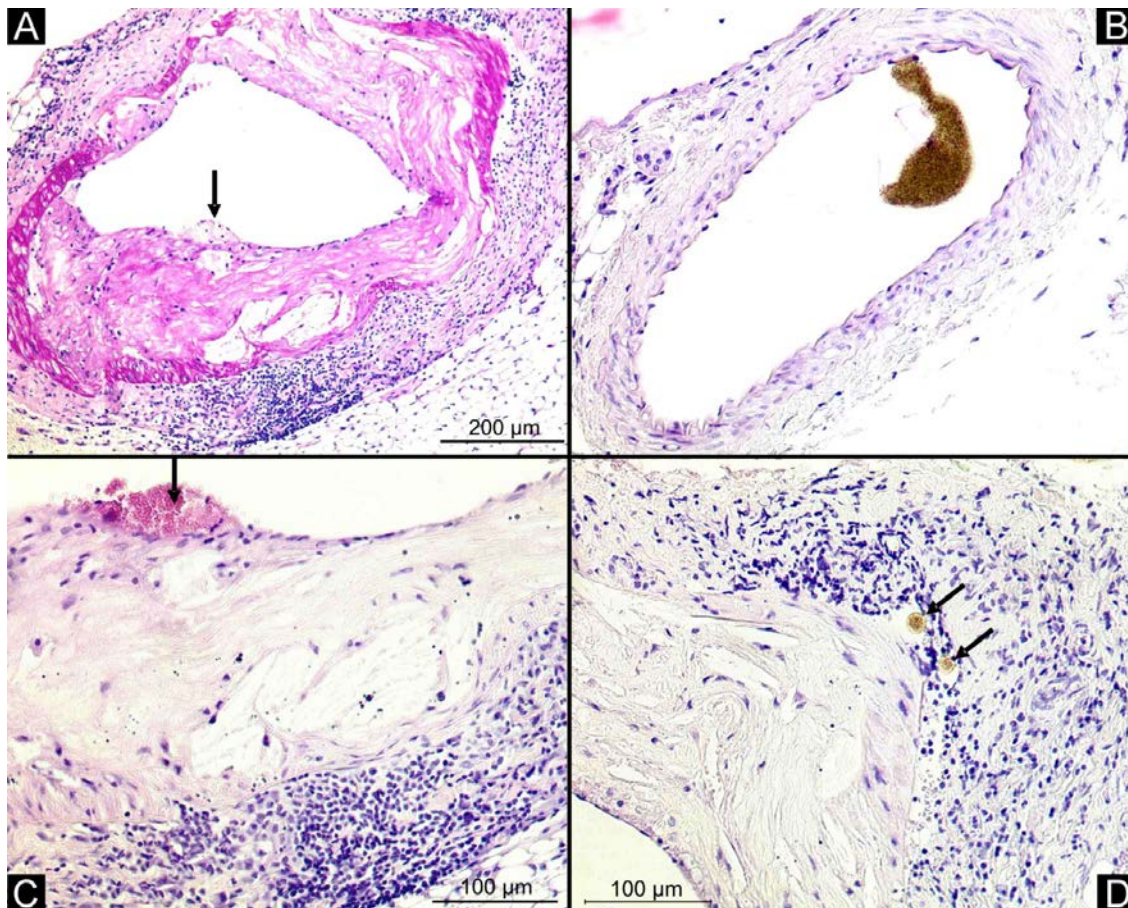
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Atherosklerotische Läsionen

Unsere Untersuchungen zeigen pathologische Veränderungen der renalen Gefäße der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse. Im Alter von achtzig Wochen weist die Nierenarterie fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen auf. In der Histologie zeigen sich fortgeschrittene atherosklerotische Plaques mit Merkmalen der Plaqueruptur, der adventitiellen Vasa Vasorum Neovaskularisierung und einer begleitenden starken adventitiellen Entzündungsreaktion (Abb. 9).

Atherosklerotische Gefäßwandveränderungen konnten bei den intrarenalen Gefäßen mit einem Durchmesser kleiner 400 µm nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den Nierenarterien der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse weisen die Aa. renales der C57/BL Tiere keine Anzeichen für atherosklerotische Veränderungen auf (Abb. 9).

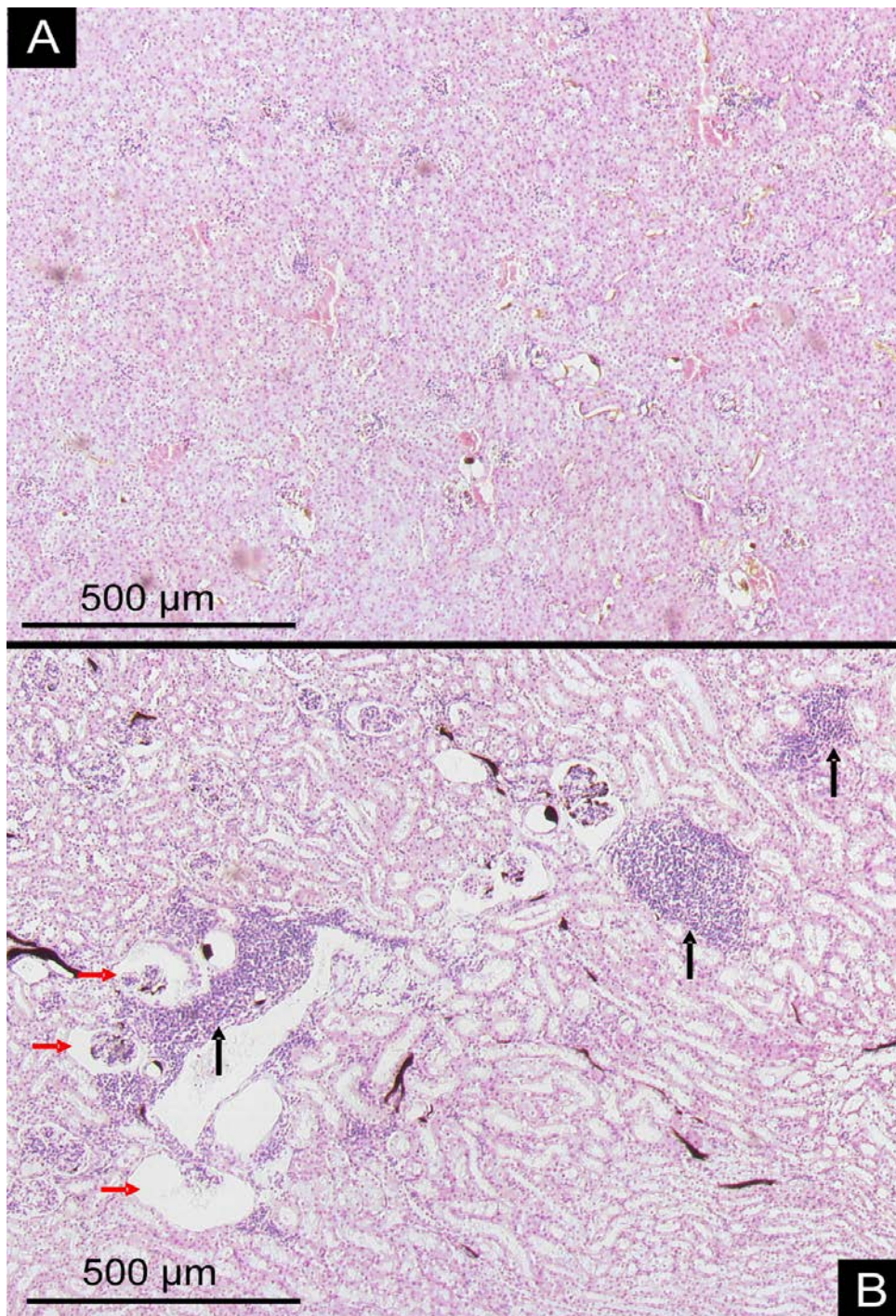


**Abbildung 9:** Histologie (A, B, PAS-Färbung, 50-fache Vergrößerung; C, D, HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung) der A. renalis der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Maus (A, C, D) mit konzentrischen atherosklerotischen Plaques (A), sowie Plaquerupturen (C, schwarzer Pfeil) und Vasa Vasorum (D, schwarze Pfeile) in der Adventitia mit einer Ansammlung von Entzündungszellen. Die Nierenarterie der Kontrolltiere zeigt keine atherosklerotischen Läsionen (B).

## 3.2 Renale Inflammation

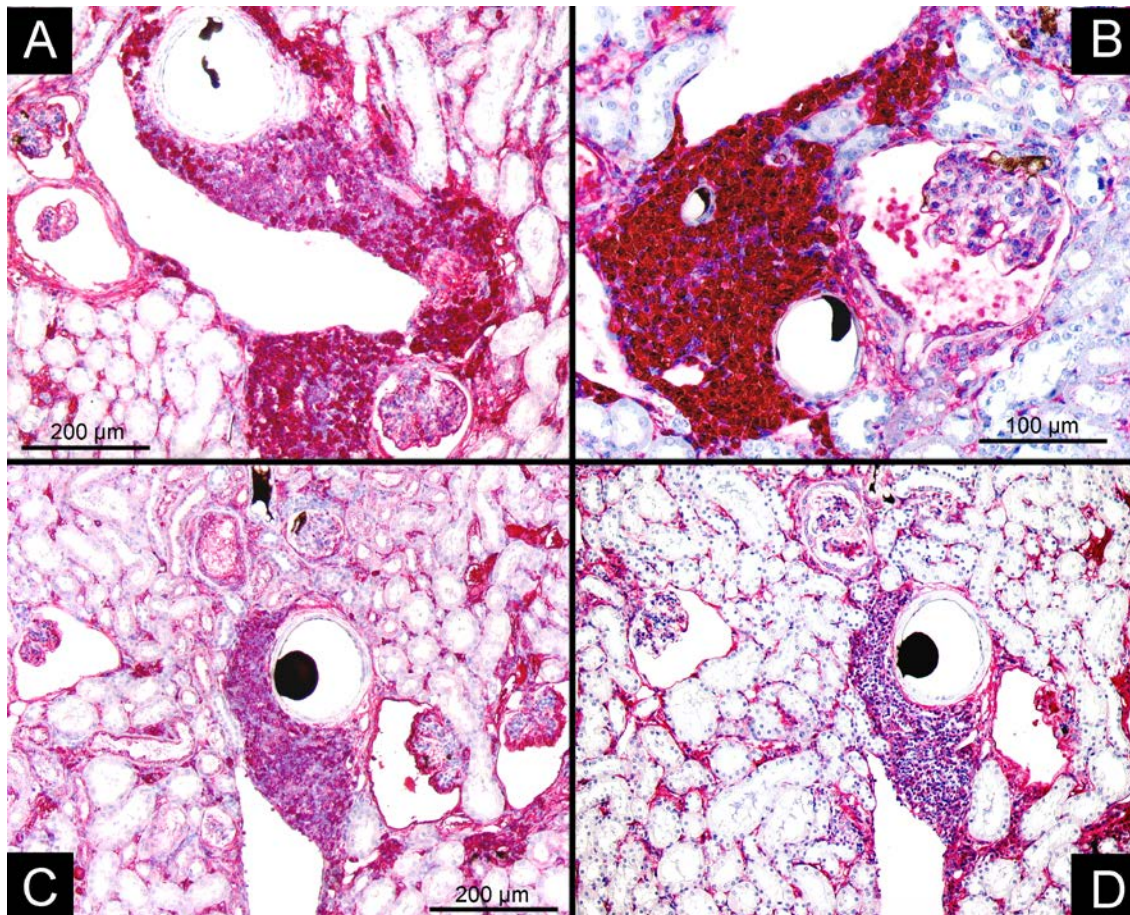
Das Nierenparenchym der C57/BL Mäuse zeigt keine pathologischen Veränderungen. Im Gegensatz dazu zeigen die Nieren der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse eine perivaskuläre Inflammation der intrarenalen Gefäße (Abb. 10). Mit Hilfe spezifischer immunhistochemischer Antikörper lassen sich in diesen Ansammlungen von Entzündungszellen vornehmlich Plasmazellen, sowie B- und T-Lymphozyten nachweisen (Abb. 11). Dabei finden sich ausschließlich bei Gefäßen mit einem Durchmesser von 150 – 300 µm derartige perivaskuläre Entzündungszellen.





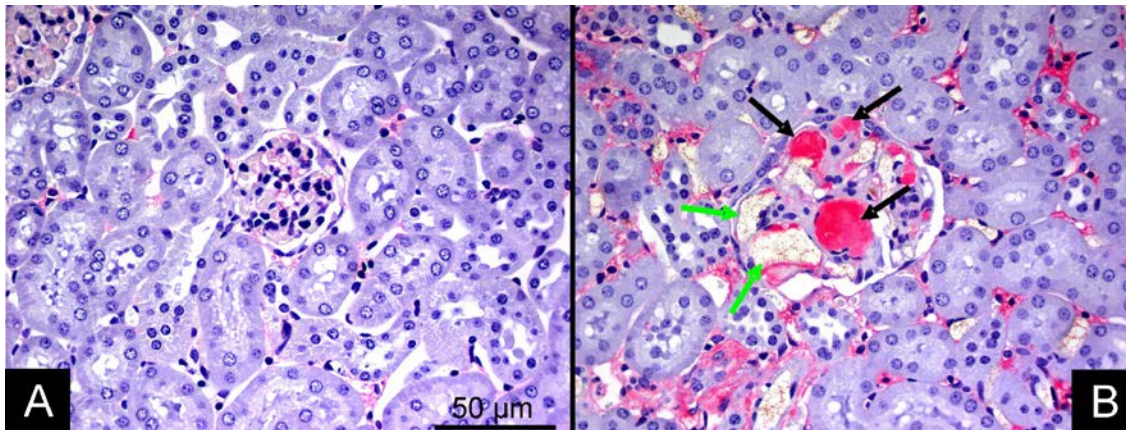
**Abbildung 10: Nierenparenchym (HE-Färbung, 25-fache Vergrößerung) der Kontrolltiere mit physiologischer Nierenarchitektur (A). Zum Vergleich Parenchymveränderung der Niere einer ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Maus mit perivaskulärer Inflammation (B, schwarze Pfeile) und pathologisch veränderten Glomeruli (B, rote Pfeile).**





**Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung (Antikörper gegen CD3 (A), CD20 (B), CD138 (C) und LC (D)) des Nierenparenchyms der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse. In den perivaskulären Ansammlungen von Entzündungszellen finden sich vorwiegend Leukozyten (A,B) und Plasmazellen (C).**

Die glomerulären Kapillaren in den Nieren der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Tiere zeigen eine aneurysmatische Aufweitung. Mittels immunhistochemischer Färbung mit polyklonalen Antikörpern gegen Faktor VIII-assoziiertes Antigen lassen sich in den Aneurysmata Faktor VIII enthaltende Lipoprotein-Emboli nachweisen. Entsprechende Veränderungen in den Kontrolltieren finden sich nicht (Abb. 12).

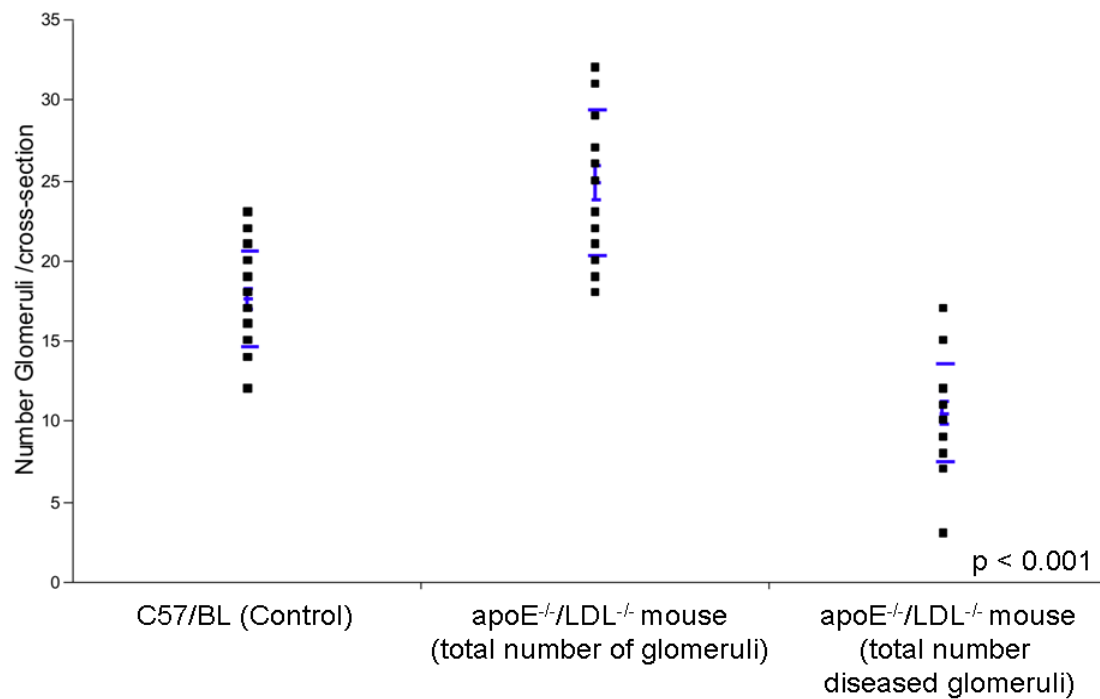


**Abbildung 12:** Immunhistochemische Färbung (Antikörper gegen Faktor VIII-assoziiertes Antigen, 200-fache Vergrößerung) der Glomeruli der C57/BL Maus (A). Im Gegensatz dazu weisen die Glomeruli der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Tiere kapilläre Aneurysmen (B, grüne Pfeile) auf, die mit Faktor VIII enthaltenden Emboli (B, schwarze Pfeile) gefüllt sind.

### 3.3 Quantitative Bildanalyse

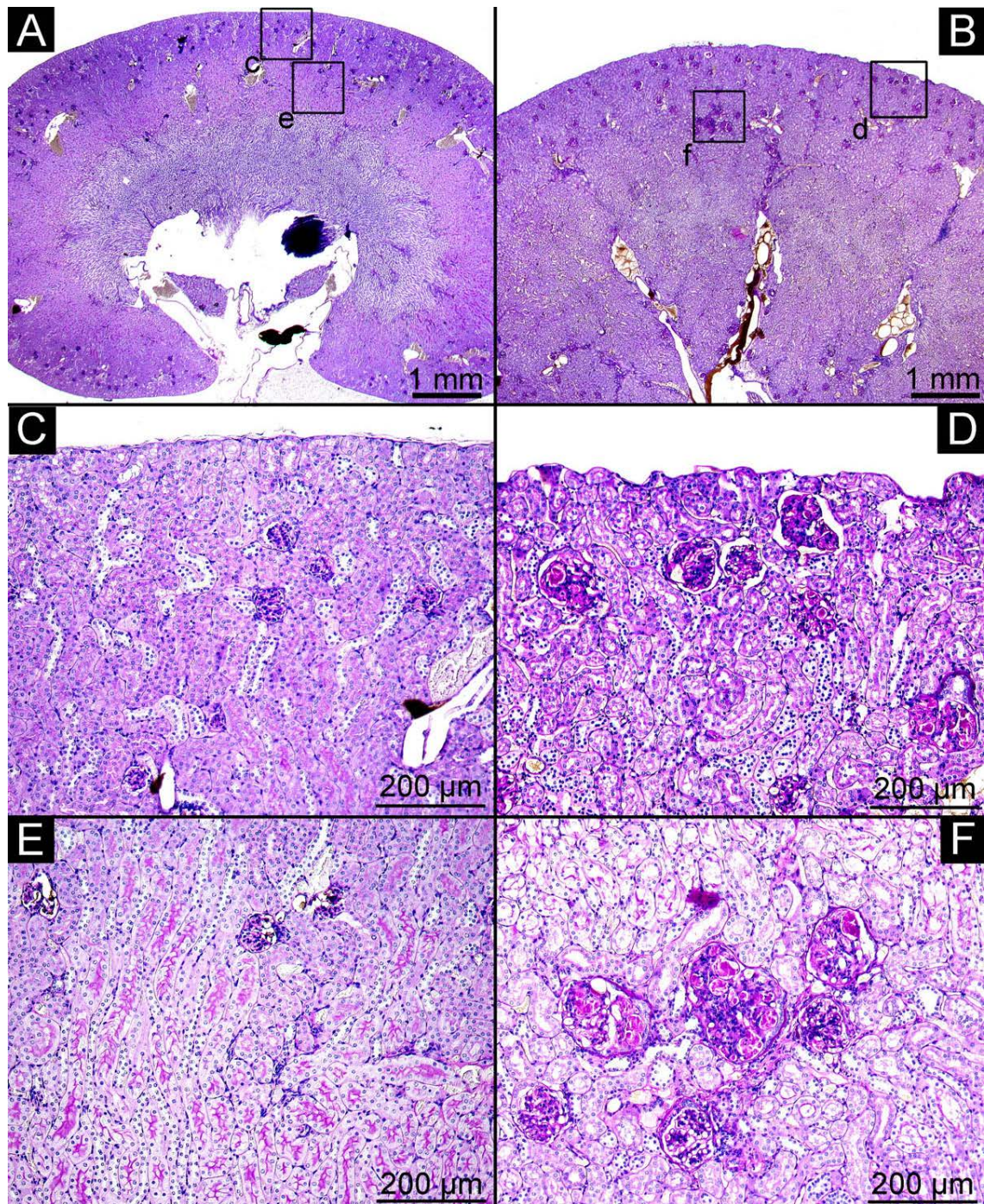
#### 3.3.1 Parameter der Glomeruli

In den Nieren der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse findet sich eine deutliche Zunahme der Gesamtanzahl der Glomeruli pro Schnittfläche im Vergleich zu den C57/BL Mäusen ( $24,8 \pm 4,5$  vs.  $17,6 \pm 3$ ;  $p < 0,001$ , Abb. 13). Neben der Menge der funktionellen Einheiten weichen die Nieren der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Tiere auch in der Struktur der Glomeruli von den Nieren der C57/BL Mäuse ab. Dabei sind insgesamt 41 % aller Glomeruli pathologisch verändert (Abb. 13). Diese weisen Anzeichen für eine Lipoprotein assoziierte Glomerulopathie auf (Abb. 14).



**Abbildung 13: Vergleich der Anzahl von Glomeruli pro Schnittfläche in den Nieren der Kontrolltiere und der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der Glomerulimenge in den ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Tieren (p < 0,001). Von diesen Glomeruli weisen 41 % pathologische Veränderungen auf.**

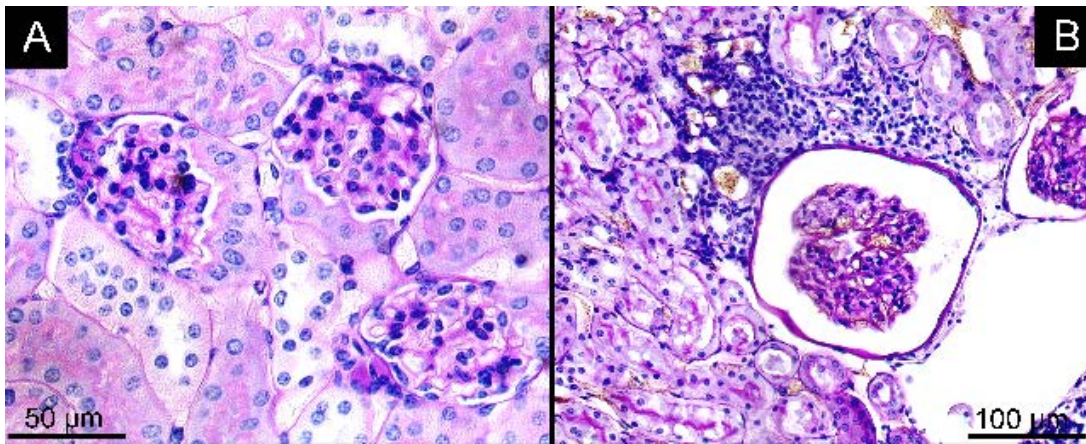




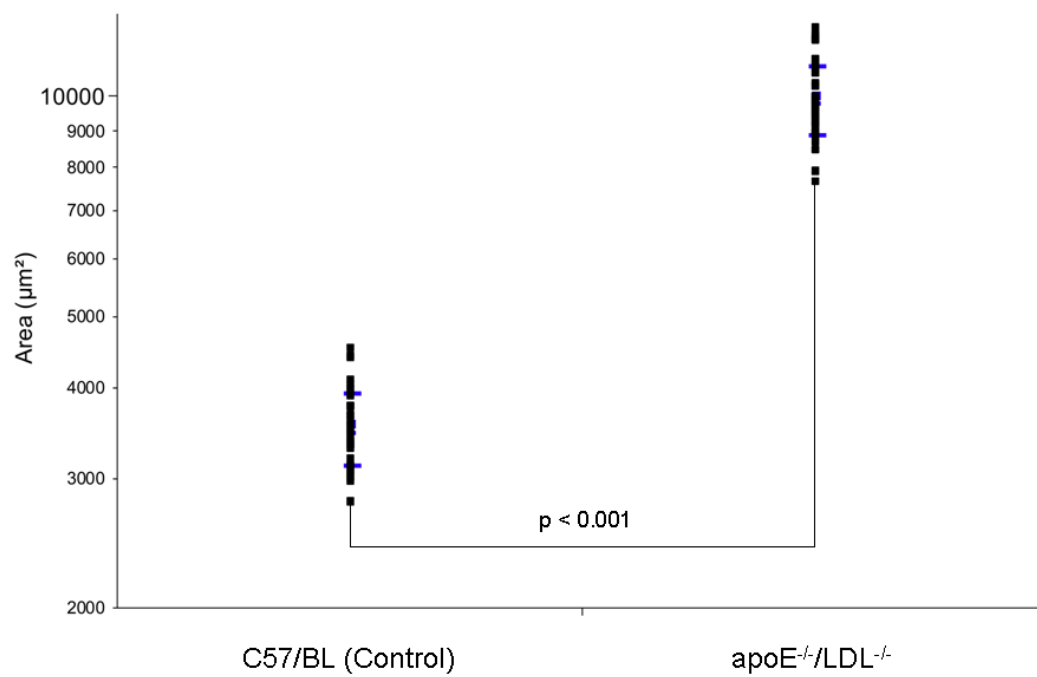
**Abbildung 14: Histologische Schnitte (PAS-Färbung; A, B, 12,5-fache Vergrößerung; C, D, E, F, 100-fache Vergrößerung) der C57/BL Mäuse (A, C, E) mit physiologischem Aufbau der Niere und regulären Glomeruli im Rindenbereich (C) und in der Übergangszone zwischen Mark und Rinde (E). Im Gegensatz dazu Nieren der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Tiere (B, D, F) mit Anzeichen einer Lipoprotein assoziierten Glomerulopathie (D, F) im Bereich des Kortex (D) und der kortikomedullären Junktionszone (F).**



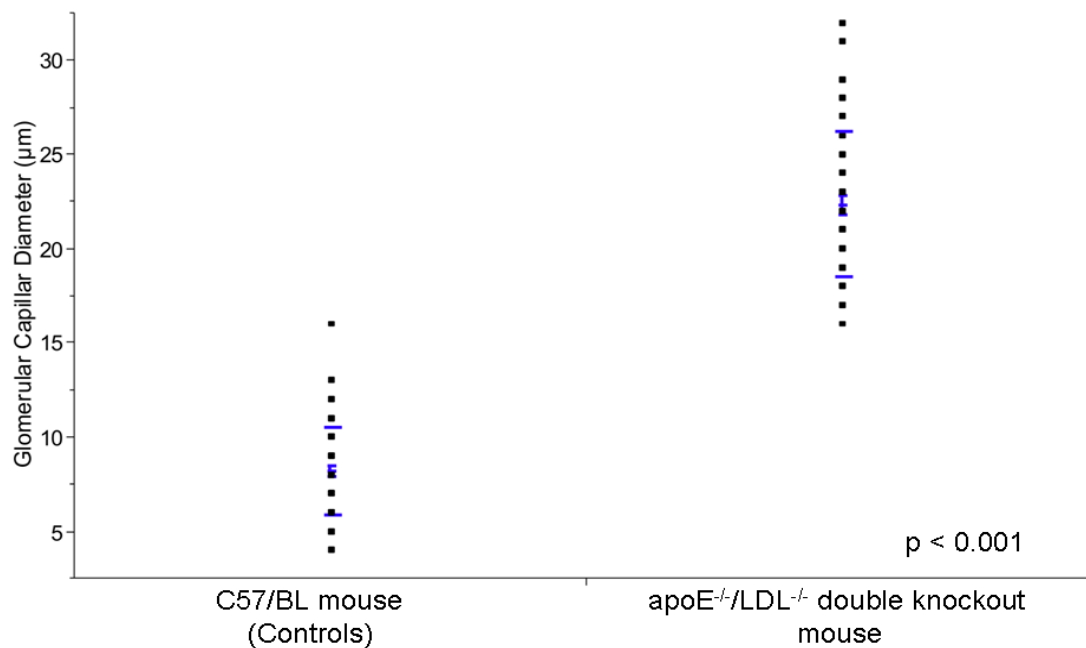
Die Fläche ( $\text{mm}^2$ ) der pathologisch veränderten Glomeruli der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Tiere zeigt eine signifikante Zunahme gegenüber den Kontrolltieren ( $9959 \pm 1083 \mu\text{m}^2$  vs.  $3533 \pm 398 \mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,001$ , Abb. 15 und Abb. 16). Neben Anzahl und Fläche der Glomeruli besteht zwischen den beiden Tiermodellen ein Unterschied in deren Kapillardurchmesser. Dieser ist in den Glomeruli der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse signifikant größer als bei den C57/BL Tieren ( $8,2 \pm 2,3$  vs.  $22,3 \pm 3,9$ ;  $p < 0,001$ , Abb. 17). 85 % aller Glomeruli der durch Doppel-Knockout veränderten Mäuse weisen derart dilatierte Kapillaren auf.



**Abbildung 15: Glomeruli (PAS-Färbung; A, 200 fache Vergrößerung; B, 100 fache Vergrößerung) von C57/BL Mäusen (A) und ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Tieren (B). Die Fläche deren Glomeruli ist deutlich vergrößert.**



**Abbildung 16: Die Fläche der Glomeruli von ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse ist signifikant vergrößert gegenüber C57/BL Kontrolltieren ( $p < 0,001$ ).**

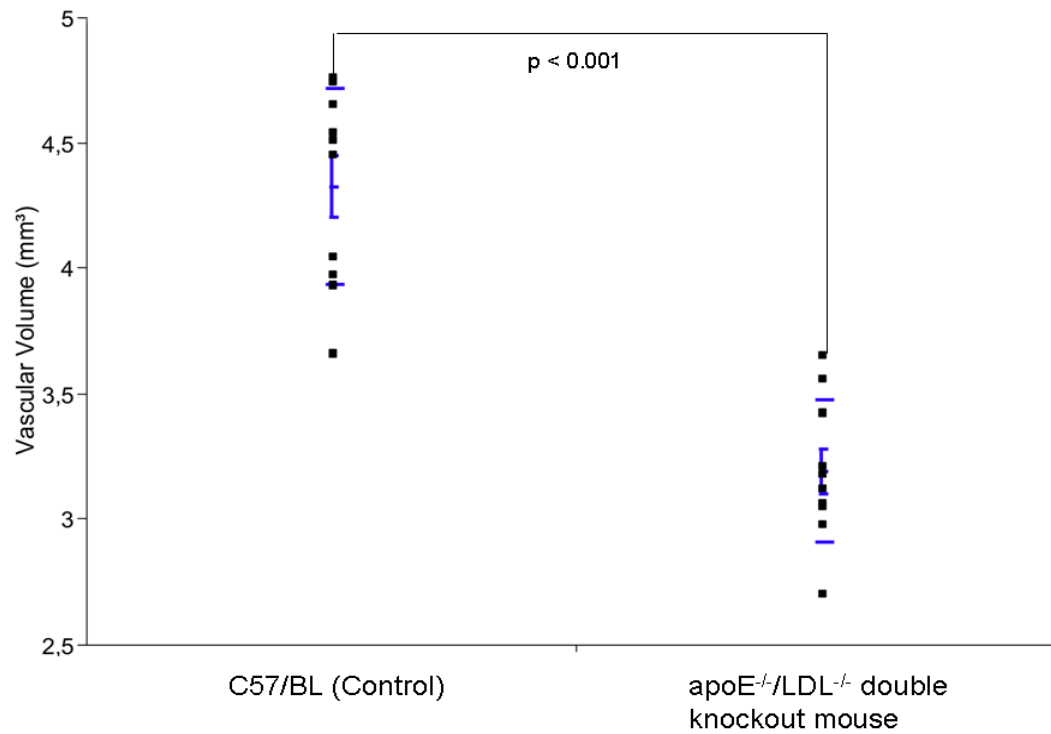


**Abbildung 17: Der Kapillardurchmesser der Glomeruli von ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse zeigt eine signifikante Zunahme gegenüber C57/BL Kontrolltieren (p < 0,001).**

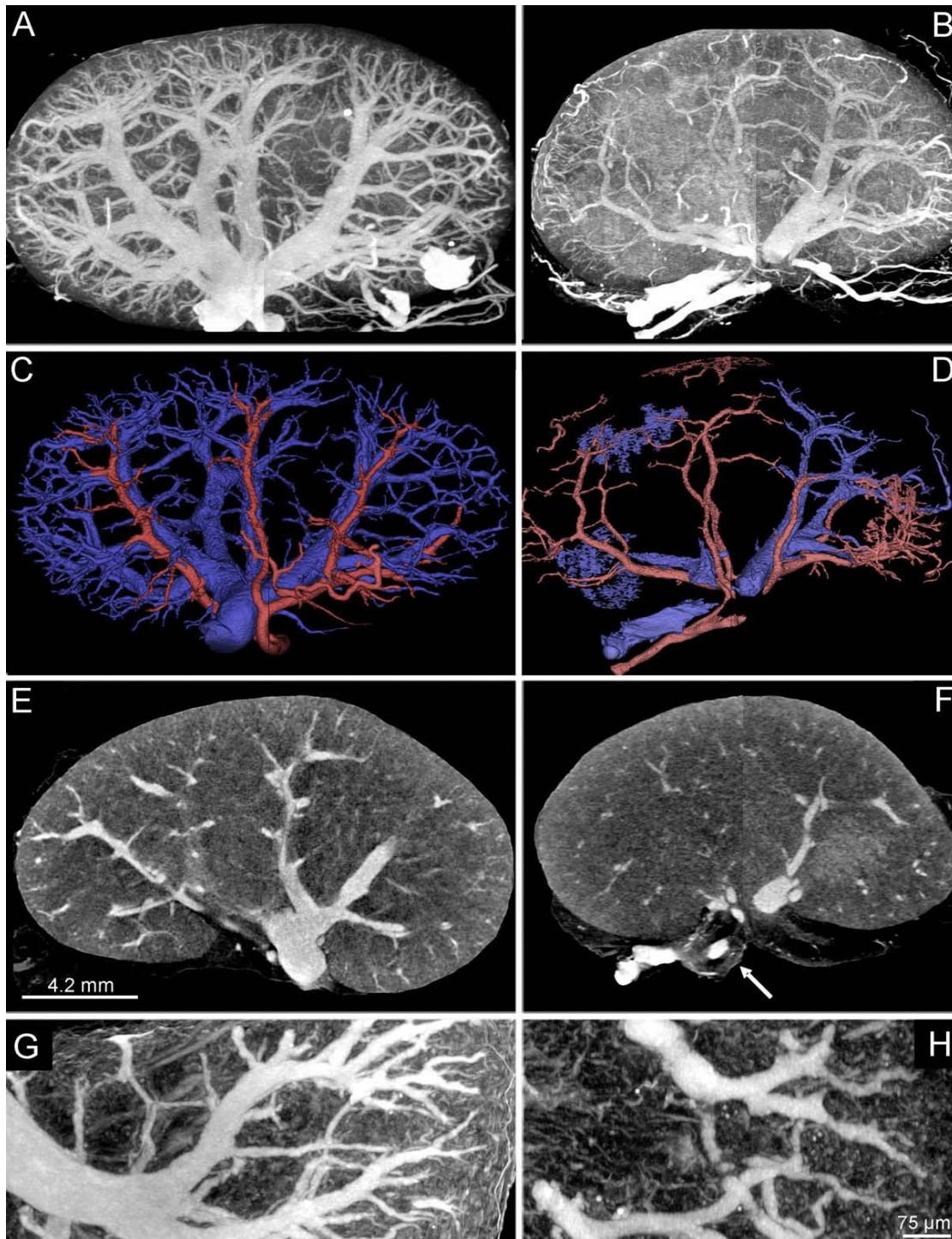
### 3.3.2 Intrarenales Gefäßvolumen

Die Nieren der achtzig Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse weisen im Vergleich zu den Nieren der Kontrolltiere eine signifikante Verminderung des intrarenalen Gefäßvolumens auf ( $3,2 \pm 0,3 \text{ mm}^3$  vs.  $4,3 \pm 0,4 \text{ mm}^3$ ; p < 0,001; Abb. 18). Die Differenzierung des Gefäßbaumes in arteriellen und venösen Schenkel zeigt, dass vor allem die Abnahme des venösen vaskulären Volumenanteils für die Reduktion des intrarenalen Gefäßvolumens verantwortlich ist ( $3,9 \pm 0,3 \text{ mm}^3$  vs.  $2,9 \pm 0,4 \text{ mm}^3$ ; p < 0,001). Im Gegensatz dazu weisen die arteriellen vaskulären Volumenanteile der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse keinen signifikanten Unterschied zu denen der C57/BL Tiere auf ( $0,3 \pm 0,1 \text{ mm}^3$  vs.  $0,4 \pm 0,1 \text{ mm}^3$ , p < 0,4). Die Gefäße der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse besitzen zudem ein inhomogenes Verzweigungsmuster und luminale Einengungen wie die Nano-CT-Bilder verdeutlichen (Abb. 19).





**Abbildung 18:** Das intrarenale Gefäßvolumen von ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse ist signifikant gegenüber C57/BL Kontrollmäusen reduziert ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 19: Mikro-CT-Aufnahmen (Maximum Intensitäts Projektionen, A, B; Einzelschnittbilder, E, F) der Kontrolltiere (A, C, E) und ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse (B, D, F). Im Vergleich zu C57/BL Tieren (A, C) weisen die ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse (B, D) ein reduziertes intrarenales Gefäßvolumen auf. Die Volume-rendering Darstellungen der Kontrollmäuse (C) und ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Tiere (D) veranschaulichen die Perfusionsterritorien von arteriellen (rot) und venösen (blau) Gefäßen. Die Nano-CT-Bilder (Maximum Intensitäts Projektionen, G, H) zeigen ein inhomogenes Verzweigungsmuster und luminale Einengungen der Gefäße in den ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäusen (H) im Unterschied zu den Kontrolltieren (G).**

## 4 Diskussion

Die Atherosklerose mit ihren Folgeerscheinungen stellt die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar. Folglich kommt der Erforschung ihrer Pathogenese und ihrer Auswirkungen auf verschiedene Organe, sowie der Entwicklung neuer Therapieoptionen, eine enorme Bedeutung zu. Tierexperimentelle Studien besitzen dabei einen besonderen Stellenwert.

In der vorliegenden Arbeit werden die strukturellen und vaskulären Veränderungen der Niere infolge systemischer Atherosklerose im Tiermodell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Maus mit Hilfe neuartiger bildgebender Verfahren präsentiert. Die Mikro- und Nano-Computertomographie sollen die renale Anatomie hochauflösend darstellen und somit morphologische Veränderungen erkennbar, vergleichbar und quantifizierbar machen.

### 4.1 Mikro-Computertomographie

Im klinischen Alltag stehen verschiedene invasive und nicht-invasive Methoden für die Gefäßdarstellung zur Verfügung. Zu nennen sind hier die digitale Subtraktionsangiographie (Pomposelli, 2010; Tang *et al.*, 2010), der intravaskuläre Ultraschall (Finet *et al.*, 1998; Nissen and Yock, 2001), die MR-Angiographie (Benveniste and Blackband, 2002; Fink *et al.*, 2003; Wiesner *et al.* 1998) und die Mehrzeilen-Computertomographie (Achenbach, 2003; Ropers *et al.*, 2003). Trotz technischer Neuerungen erzielen diese Verfahren jedoch kaum Ortsauflösungen einer Größenordnung von < 500 µm. Somit stellt die Histologie bis heute den Goldstandard in der Bildgebung sowie quantitativen Auswertung von Strukturen geringerer Größenordnung dar. Hiermit lassen sich ebenso feine Weichteildetails (z.B. Alveolarwände) wie auch prä- und postkapilläre Blutgefäße visualisieren. Nichtsdestotrotz weist die Histomorphometrie gewisse Nachteile auf. Die Probenaufarbeitung bei dieser Untersuchungsmethode ist sowohl zeit- als auch personalintensiv. Nur einzelne Segmente eines Gefäßes werden analysiert und bei der Quantifizierung der Gefäßparameter (z.B. Lumenweite, Verzweigungsmuster, endotheliale Oberfläche und Wanddicke) berücksichtigt. Mittels der anhand von wenigen Mikrometern erzielten Ergebnisse wird anschließend auf die Gesamtheit des

Gefäßes rückgeschlossen. Durch eine lediglich zufällige Auswahl des zu untersuchenden Segments ist es jedoch nicht möglich Heterogenitäten von segmentalen Gefäßwandveränderungen zuverlässig zu erfassen. Bedingt durch die Destruktivität der histologischen Aufarbeitung steht das zu erforschende Gewebe zudem anschließend nicht mehr für weitere dreidimensionale quantitative Untersuchungen zur Verfügung. Durch das zweidimensionale Messverfahren selbst gelingt es jedoch nicht die Dreidimensionalität der Gefäßarchitektur komplett darzustellen. Somit sind kontinuierliche longitudinale Messungen im Rahmen der histologischen Morphometrie nicht realisierbar.

Seit der Einführung der Mikro-CT-Technologie stellt diese ein alternatives Verfahren zur quantitativen Histologie in der Ex-vivo-Grundlagenforschung dar.(Jorgensen *et al.*, 1998;Wan *et al.*, 2002;Lerman and Ritman, 1999) Die Mikro-Computertomographie ermöglicht eine vollständige dreidimensionale Abbildung der Gefäßarchitektur. Dabei zeigen die mit Hilfe der Mikro-CT-Technik ermittelten Werte in der Vergleichsanalyse eine hochsignifikante Korrelation zu histomorphometrischen Daten.(Balto *et al.*, 2000;Langheinrich *et al.*, 2004b;Maehara, 2003;Won *et al.*, 2003) Durch die zerstörungsfreie Darstellung steht die Probe zudem im Anschluss für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung. Zusätzlich zur Gewebedifferenzierung bietet die Mikro-CT-Technologie außerdem die Möglichkeit durch Erstellen eines lückenlosen dreidimensionalen Datensatzes die kontrastverstärkten Gefäße zu quantifizieren. Somit können Informationen über die Gefäßdichte, die Gefäßoberfläche und das Gefäßvolumen gewonnen werden.

Anfänglich wurde die Mikro-Computertomographie zur Darstellung und Quantifizierung spongiösen Knochens in Osteoporose-Studien angewandt.(Engelke *et al.*, 1999) Bereits unter Einsatz der ersten Geräte war es aufgrund der großen Dichteunterschiede zwischen Knochenbälkchen und Markräumen möglich, qualitativ hochwertige dreidimensionale Bilder anzufertigen.(Shibata and Nagano, 1996) Die Forschungsgruppe Ritman und Mitarbeiter arbeitete zudem erstmalig an Methoden zur Beurteilung einer Struktur-Funktionsbeziehung von ossären Proben. In Ergänzung zur dreidimensionalen Visualisierung und Vergleichsanalyse mit der standardisierten Histomorphometrie wurde der Zusammenhang von physiologischem Knochenremodeling und nutritiven Gefäßen mittels Mikro-CT-Bildgebung untersucht.(Ritman *et al.*, 1998)

Im Laufe der Jahre hat sich der Anwendungsbereich der Mikro-CT-Technologie deutlich vergrößert. Besonders die Etablierung alternativer Perfusionstechniken und neuer vaskulärer Kontrastmittel hat zu einer Weiterentwicklung auf dem Gebiet der

Gefäßforschung mittels Mikro-CT geführt. Durch Kontrastmittelapplikation kann eine Kontrastverstärkung und somit bessere Gewebedifferenzierung erreicht werden. Zahlreiche Studien haben sich mit verschiedenen Perfusionstechniken befasst.(Frederik and van Doorn, 1973;Gade, 1977;Grundmann *et al.*, 1974;Kratky *et al.*, 1989;Nettum, 1995) Als ausschlaggebend für eine homogene Gefäßperfusion wurde die primäre Entfernung von Blutbestandteilen aus der Gefäßstrombahn konstatiert.

Wir setzten das Kontrastmittel Microfil® ein. Bereits in den 70er Jahren konnte nachgewiesen werden, dass dieses die Möglichkeit einer kontinuierlichen und homogenen Perfusion von arteriellen Gefäßanteilen bietet. Microfil® besitzt durch seine beiden Komponenten, Blei und Silikon, welche in wässriger Lösung vorliegen, bedeutende Vorteile gegenüber bariumsulfathaltigen Kontrastmitteln. Die geringere Viskosität führt zu einer besseren Penetration in die Kapillaren. Zudem verhindern die hydrophoben Eigenschaften des Kontrastmittels den Austritt in den extravaskulären Raum.

Microfil® wurde in der Vergangenheit zur Darstellung der Vasa Vasorum von Koronargefäßen (Kwon *et al.*, 1998;Gossl *et al.*, 2003;Kantor *et al.*, 1999), der Nierenarterien (Garcia-Sanz *et al.*, 1998;Fortepiani *et al.*, 2003;Ortiz *et al.*, 2000;Bentley *et al.*, 2002), der Pulmonalarterien (Karau *et al.*, 2001a;Karau *et al.*, 2001b), der Corpora cavernosa (Simopoulos *et al.*, 2001) sowie der arteriellen und portalvenösen Lebergefäße (Wan *et al.*, 2000) eingesetzt. In diesen Arbeiten wird deutlich, dass sich der vaskulären Forschung durch die Mikro-CT-Technologie mit begleitender Kontrastmittelperfusion vollkommen neue Möglichkeiten erschließen. Es sollte nichtsdestotrotz erwähnt werden, dass, unabhängig von Perfusionstechnik und Kontrastmittel, eine vollständige und lückenlose Perfusion nicht immer erzielt werden kann. Doch nur durch eine ausreichende Gefäßfüllung und somit Kontrastierung können vaskuläre Strukturen exakt visualisiert und quantifiziert werden.

Erstmalig wurde die dreidimensionale Gefäßarchitektur verschiedener Organe anhand von Mikro-CT-Datensätzen von der Arbeitsgruppe um Jorgensen untersucht.(Jorgensen *et al.*, 1998) In ihrer Studie gelang nach intravasaler Kontrastmittelapplikation unter anderem die dreidimensionale Darstellung der intramuralen Vasa vasorum von Schweinen. Weiterführende Arbeiten von Wan und Mitarbeitern erforschten im Mikro-CT mit Kontrastmittel perfundierte Koronararterien der Ratte.(Wan *et al.*, 2002) Das vollständige Verzweigungsmuster der Rattenkoronarien konnte gezeigt und damit die Gefäßvolumina quantifiziert werden.

Eine adäquate Funktion des Nephrons ist von der räumlichen Beziehung zwischen den renalen Gefäßen und dem tubulären System abhängig. Die Visualisierung der dreidimensionalen Mikrostruktur der Niere mittels Mikro-CT-Technologie war daher in der Vergangenheit Inhalt verschiedener Studien. Untersucht wurde der Effekt einer chronischen Gallengangligatur auf das renale Gefäßsystem bei Ratten.(Ortiz *et al.*, 2000) Fortepiani und Mitarbeiter zeigten mit Hilfe der Mikro-Computertomographie den Einfluss einer Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthese auf das intravasale Volumen der Rattenniere.(Fortepiani *et al.*, 2003) Zudem evaluierten sie die Auswirkungen des AT1-Antagonisten Losartan auf die Gefäßfüllung in diesem Tiermodell. Toyota *et al.* erforschten die morphologischen Charakteristika der Niere im frühen Stadium der diabetischen Nephropathie durch Quantifizierung des glomerulären Volumens.(Toyota *et al.*, 2004) Am Großtiermodell des Schweins wurde die Assoziation von Hypercholesterinämie und Gefäßdichte im Bereich der Cortex renalis untersucht.(Bentley *et al.*, 2002; Chade *et al.*, 2004) Die Gefäßarchitektur der Nierenrinde des Schweins wurde des Weiteren unter Einfluss von vermehrtem oxidativem Stress beim Vorliegen einer Nierenarterienstenose unter Verwendung der Mikro-CT-Technologie dargestellt.(Zhu *et al.*, 2004)

Infolge technischer Innovationen sind inzwischen ebenso In-vivo-Mikro-CT-Scanner zur Untersuchung kleiner Labortiere verfügbar. Persy und Mitarbeiter zeigten, dass die In-vivo-Mikro-Computertomographie eine sensitive Methode zum Nachweis von Kalzifikationen der thorakalen Aorta in chronisch niereninsuffizienten Ratten darstellt.(Persy *et al.*, 2006) Zur Morphometrie trabekulären Knochens im Osteoporosemodell der Ratte fand das Verfahren ebenfalls Anwendung.(Kinney *et al.*, 1998) In-vivo-Studien an Mäusen beschäftigten sich weiterhin mit der Detektion von Lungenemphysemen (Postnov *et al.*, 2005) und Lungentumoren (De Clerck *et al.*, 2004). Die Untersuchung lebendiger Kleintiere mittels Mikro-Computertomographie ermöglicht der bildgestützten Grundlagenforschung völlig neue Perspektiven. Sowohl physiologische als auch pathologische Veränderungen können in longitudinalen Studien evaluiert werden. Nichtsdestotrotz weist auch diese Methode gewisse Nachteile auf. Zu erwähnen sind Bewegungsartefakte, die Notwendigkeit einer Anästhesie für die Scandauer und die Strahlenexposition sowie deren Folgeschäden.

In der vorliegenden Studie konnte die dreidimensionale Gefäßarchitektur der Niere der Maus unter physiologischen und pathologischen Bedingungen visualisiert und quantitativ erfasst werden. Somit zeigte sich die Mikro-Computertomographie als eine sensitive Technik zur Darstellung und Quantifizierung von renalen Gefäßalterationen.

Eine dreidimensionale Mikro-CT-Analyse humaner Organe könnte zukünftig dazu beitragen den Einfluss verschiedener systemischer Krankheiten wie Atherosklerose oder Autoimmunerkrankungen auf die renale Funktion, welche häufig durch mikrovaskuläre und strukturelle Veränderungen charakterisiert ist, zu erforschen. Des Weiteren eröffnet sich die Möglichkeit mit Hilfe der Mikro-CT-Technologie quantitative Informationen über Gefäßveränderungen während des Beginns, der Dauer sowie nach Beendigung einer antiinflammatorischen Therapie zu erhalten.

## 4.2 Nano-Computertomographie

Die Einführung der Nano-Computertomographie als technische Weiterentwicklung der Mikro-CT stellt einen großen Fortschritt im Bereich der medizinischen Forschung dar. Unter Verwendung dieser Methode ist man heute in der Lage dreidimensionale Strukturen im Submikrometerbereich zu analysieren. Es können Aufnahmen mit einer Detailerkennung von bis zu 150 nm generiert werden.(Cnudde *et al.*, 2006)

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der Geräte finden sich in der Literatur bisher jedoch nur wenige Studien zur Gefäßanalyse mittels Nano-Computertomographie. Anwendung fand das Verfahren beispielsweise zur Darstellung und Quantifizierung von Vasa vasorum der Aorta von ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäusen (Kampschulte *et al.*, 2010) sowie zur Visualisierung und Analyse des zerebralen Gefäßsystems im Ischämiemodell der Ratte.(Langheinrich *et al.*, 2010) Zudem wurde die Nano-CT-Technologie zur Untersuchung des glomerulären Kapillarsystems von Schweinen mit Nierenarterienstenose eingesetzt.(Brinkmann *et al.*, 2011)

In der vorliegenden Arbeit konnten wir mit Hilfe der Nano-CT-Bildgebung erstmals die morphologischen Grundlagen der renalen Gefäßveränderungen im Atherosklerosemodell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Maus veranschaulichen. Diese weisen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikante Verminderung des intrarenalen Gefäßvolumens auf. Zudem zeigen die Nierengefäße inhomogene Verzweigungsmuster und luminale Einengungen.

Unsere Studie bietet somit einen methodischen Ansatz zur nichtdestruktiven Visualisierung und Analyse des renalen Gefäßsystems sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen mittels Nano-Computertomographie. Im

Rahmen der Atheroskleroseforschung könnte die Nano-CT in weiterführenden Arbeiten zu neuen Erkenntnissen über therapeutische Optionen beitragen.

### 4.3 Tiermodell

Cullen und Mitarbeitern (Cullen *et al.*, 2003) zeigten in ihrer Studie zur Ruptur atherosklerotischer Plaques Kriterien zur Wahl eines Tiermodells:

- Die Atherogenese sollte histologisch vergleichbar zu der des Menschen sein.
- Die atherosklerotischen Plaques sollten die gleiche Vulnerabilität wie die humaner Plaques aufweisen.
- Therapiestudien sollten auf den Menschen übertragbar sein.
- Die Spezies sollte der Forschung zur Verfügung stehen und in der Haltung sowohl einfach als auch ökonomisch sein.

De facto ist es überaus schwierig wenn nicht gar unmöglich ein Tiermodell zu finden, welches alle oben genannten Kriterien erfüllt. So wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl verschiedener Tiermodelle entwickelt, welche neben der in unserer Studie eingesetzten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Maus in der Atheroskleroseforschung Anwendung finden.

Zu den in der Literatur häufig aufgeführten Tiermodellen zählen Kaninchen, welche nach Verabreichung einer cholesterin- und fettreichen Diät atherosklerotische Läsionen entwickeln.(Ito *et al.*, 2012;Barnes and Weinberg, 1999;Lu *et al.*, 2012;Arad *et al.*, 1989) Bereits 1913 beobachtete Anitschkow in seiner Studie die Anreicherung von Cholesterin in der Aorta, der mit Cholesterin gefütterten Kaninchen.(Anitschkow, 1913) Jedoch unterscheiden sich die Atherome in ihrer Zusammensetzung wesentlich von den Läsionen, die beim Menschen beobachtet werden können. Zum einen sind sie fettiger und zum anderen enthalten sie eine größere Anzahl an Makrophagen. Zudem überschreiten die resultierenden Plasma-Cholesterinspiegel deutlich die beim Menschen auftretenden Werte.(Badimon, 2001)

Von allen Kaninchenrassen werden die meisten aktuellen Studien an den Weißen Neuseeland Kaninchen (New Zealand White (NZW) rabbit) durchgeführt.(Yanni, 2004)



Von diesen existieren einige genetisch veränderte Arten, wie beispielsweise die Houston RT-, die St. Thomas und die WHHL-Kaninchen (Watanabe-Heritable-Hyperlipidemic). Letztere finden am häufigsten Anwendung und leiden unter einem Defekt des LDL-Rezeptors. Folglich weisen sie aufgrund der gestörten Aufnahme von LDL aus dem Blut stark erhöhte Plasma-Lipidkonzentrationen auf. (Kita *et al.*, 1981; Tanzawa *et al.*, 1980) Es können Gesamtcholesterinspiegel von 300-700mg/dl sowie Triglyzeridkonzentrationen von 300-400mg/dl vorliegen. (Kobayashi *et al.*, 2011) Der atherosklerotische Prozess beginnt bei den Watanabe-Kaninchen bereits in utero. (Aliev and Burnstock, 1998; Yanni, 2004) Sie entwickeln spontan Xanthome und atherosklerotische Läsionen, welche den im menschlichen Organismus nachgewiesenen atherosklerotischen Veränderungen stark ähneln. (Watanabe, 1980)

Das in der Wissenschaft sehr häufig eingesetzte Tiermodell der Ratte eignet sich nur bedingt für die Anwendung im Rahmen von Atherosklerosestudien. Diese Tatsache lässt sich durch das Fehlen von sich spontan entwickelnden Gefäßwandveränderungen begründen. (Badimon, 2001; Cullen *et al.*, 2003) Vaskuläre Läsionen entstehen bei diesen Tieren ausschließlich durch eine enorme Abwandlung ihrer natürlichen Diät. (Jawien *et al.*, 2004) So gelang es Joris *et al.* durch Verabreichung einer cholesterinreichen Diät in Kombination mit Cholsäure und Thiouracil das Fortschreiten sogenannter „fatty streaks“ hin zu atherosklerotischen Plaques zu induzieren. (Joris *et al.*, 1983) Weiterhin werden in der Literatur verschiedene unter hereditärer Hyperlipidämie leidende Rattenstämme beschrieben, welche atherosklerotische Veränderungen zeigen. (St. John and Bell, 1991; Russell *et al.*, 1993) Hingegen gibt es bisher nur wenige transgene Modelle der Ratte, welche atherosklerotische Läsionen entwickeln. (Herrera *et al.*, 1999; Richardson *et al.*, 1998; Russell *et al.*, 1998)

In der Atheroskleroseforschung existieren weiterhin verschiedene Großtiermodelle. Zu nennen sind hier nichthumane Primaten wie Schimpansen, Totenkopffäffchen, Brüll- und Rhesusaffen. Die Gabe von atherogenem Futter führt bei diesen Tieren zur Bildung atherosklerotischer Läsionen. (Andrus and Mann, 1956; Cullen *et al.*, 2003) Dieser Prozess nimmt im Allgemeinen mehrere Monate bis zu mehreren Jahren in Anspruch. (Mondy *et al.*, 1997) Die resultierenden Plaques weisen in ihren morphologischen Charakteristika eine bedeutende Ähnlichkeit zu menschlichen Läsionen auf. (Stary and Malino, 1982; Jokinen *et al.*, 1985) Aufgrund der deutlichen Gemeinsamkeiten zwischen humanen und nichthumanen Primaten (Todd *et al.*, 1972) gelten letztere deshalb für den Einsatz in Studien über die menschliche kardiovaskuläre Pathologie im Vergleich zu Nagern und Kaninchen als besser

geeignet.(Vilahur *et al.*, 2011) Bereits im Jahr 1965 veröffentlichten Malinow und Maruffo eine Forschungsarbeit über die Aortenatherosklerose im Tiermodell des Affen.(Malinow and Maruffo, 1965) Es folgten weitere Studien, beispielsweise über die Auswirkungen eines LDL-Rezeptordefektes auf die Plasmalipidkonzentrationen und der daraus resultierenden Atherogenese in Rhesusaffen.(Scanu *et al.*, 1988;Kusumi *et al.*, 1993) Trotz der zahlreichen Erkenntnisse, die mit Hilfe des Tiermodells der nichthumanen Primaten über die Atherosklerose in der Vergangenheit gewonnen werden konnten, beschränkt sich der Einsatz in der Gegenwart jedoch auf nur wenige Forschungsaspekte. Untersucht werden verschiedene den atherosklerotischen Prozess beeinflussende Faktoren wie psychosozialer Stress, Verhaltensweisen und geschlechtsspezifische Unterschiede.(Kaplan *et al.*, 1996;Rozanski *et al.*, 1999) Ursächlich hierfür ist zum einen die sowohl aufwendige als auch kostenintensive Haltung der Tiere, zum anderen die lange Zeitdauer bis zur Entwicklung atherosklerotischer Läsionen.(Lafont and Faxon, 1998) Auch ethische Faktoren sprechen gegen ein realistisches Modell. So ist ein Großteil dieser Spezies vom Aussterben bedroht. Diese Tatsache förderte den Einsatz eines kostengünstigeren und zugänglicheren Großtiermodells, wie das des Schweins.

Das Schwein eignet sich aufgrund verschiedener Aspekte gut als Tiermodell der Atherosklerose. Es besitzt eine dem Menschen vergleichbare kardiovaskuläre Anatomie (Vilahur *et al.*, 2011) und ähnelt diesem ebenfalls in hämodynamischen und metabolischen Aspekten.(Li *et al.*, 2011) Zudem entwickeln die Tiere auch bei Gabe von gewöhnlichem Schweinefutter spontan atherosklerotische Läsionen.(Fuster *et al.*, 1985) Es existieren außerdem Schweinerassen, welche unter dem Einfluss von Stress einen plötzlichen Herztod erleiden, wie die White Belgian pigs.(Badimon, 2001) Durch Fütterung einer cholesterinreichen Nahrung kommt es bei den Tieren zu einer Veränderung der Plasmalipidzusammensetzung, wie sie auch beim Menschen beobachtet werden kann.(Muller *et al.*, 1992) Es resultieren atherosklerotische Plaques, die in ihrem Verteilungsmuster und ihrer Morphologie den humanen Läsionen stark ähneln, ebenso wie in der Abfolge ihres Entstehungsprozesses von Lipidablagerungen über die Bildung von Schaumzellen hin zur fibrozellulären Proliferation und Kalzifikation.(Muller *et al.*, 1992) Dem gegenübergestellt birgt das Schweinmodell jedoch auch gewisse Nachteile. Die Haltung der Tiere verursacht hohe Kosten und erfordert spezielle Anlagen, welche die Möglichkeiten vieler Labore überschreiten. Das schnelle Wachstum verbunden mit der rapiden Gewichtszunahme erschwert zudem den Einsatz des Schweins in Langzeitstudien. Aus diesem Grund

werden zur Forschung zunehmend Miniaturschweine herangezogen, wie zum Beispiel das Yucatan-Minischwein.(De Smet *et al.*, 1998)

Ein Tier, welches sich ebenso wie bei den Ratten beschrieben schlecht als Atherosklerosemodell eignet, ist der Hund. Dieser bildet spontan keine atherosklerotischen Veränderungen aus und selbst die Verabreichung eines stark cholesterinhaltigen Futters führt nicht zu fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen.(Mahley *et al.*, 1974) Unter Verwendung einer speziellen Diät kann bei den Tieren dennoch eine experimentelle Atherosklerose induziert werden. Diese Diät enthält zum einen sehr hohe Fett- und Cholesterinanteile, zum anderen eine ungenügende Menge an essentiellen Fettsäuren.(Butkus *et al.*, 1976) Auch die Kombination aus atherogener Nahrung und einer durch Thyreoidektomie oder Thyreostatika erzielten hypothyreoten Stoffwechsellage ruft in den Tieren Plaques hervor.(Jokinen *et al.*, 1985)

Zusammenfassend betrachtet wird deutlich, dass sich Großtiermodelle nur bedingt zum Einsatz in der Atheroskleroseforschung eignen. Die gegen diese Tiere sprechenden Fakten (wie hohe Kosten, ethische Bedenken, Schwierigkeiten in der Haltung und Mangel an transgenen Modellen) stellen sich im Umkehrschluss als Vorteile der Kleintiermodelle dar. Gleiches gilt auch für das von uns genutzte Modell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Maus.

Die Maus stellt gegenwärtig das am häufigsten in der Atheroskleroseforschung eingesetzte Tiermodell dar. Im Allgemeinen sind Mäuse jedoch gegenüber dem Prozess der Atherogenese in hohem Maße resistent mit Ausnahme der C57/BL6 Maus.(Jawien *et al.*, 2004) Die Tiere dieses Stammes zeigen unter Verabreichung einer Cholsäure enthaltenden, cholesterin- und fettreichen Diät sowohl eine massive Veränderung der Plasmalipidzusammensetzung als auch frühe atherosklerotische Läsionen wie die „fatty streaks“.(Nishina *et al.*, 1990;Paigen *et al.*, 1985) Jedoch kommt es bei den C57/BL6 Tieren meist nicht zur Ausbildung fortgeschrittener Gefäßveränderungen.(Jawien *et al.*, 2004) Zusätzlich finden sich die Läsionen wie bei Mäusen allgemein nicht an den für den Menschen typischen Lokalisationen wie den Koronarien, Karotiden und peripheren Gefäßen, sondern vor allem im Bereich der Aortenwurzel und des Aortenbogens.(Getz and Reardon, 2012)

Mit der Einführung transgener Mausmodelle begann ein neues Zeitalter für die Erforschung der Atherogenese. Diese Tiere ermöglichen es die Interaktion von Umweltbedingungen mit einzelnen oder mehreren Genen zu untersuchen. Im Jahr 1992 wurde das Modell der Apolipoprotein-E-defizienten Maus entwickelt.(Piedrahita *et*

*al.*, 1992; Plump *et al.*, 1992) Dieses war das erste Mausmodell, das dem Menschen ähnliche Gefäßveränderungen aufweist, welche das gesamte Spektrum der Läsionen während der Atherogenese zeigen. (Nakashima *et al.*, 1994) Ein weiterer positiver Aspekt der ApoE<sup>-/-</sup>-Knockout Maus ist die Tatsache, dass die Tiere auch bei Gabe von gewöhnlichem fettarmem Nagerfutter bereits komplexe atherosklerotische Veränderungen ausbilden. (Getz and Reardon, 2012) Das Ausmaß der Atherogenese kann zudem durch die Verabreichung einer fett- und cholesterinreichen Diät gesteigert werden. (Nakashima *et al.*, 1994) Das für den Menschen bedeutsamste Ereignis, die Plaqueruptur mit nachfolgendem Gefäßverschluss, findet sich in diesen Tieren jedoch nicht. (Li *et al.*, 2011)

Nach der Entwicklung der ApoE<sup>-/-</sup>-Knockout-Tiere folgten weitere transgene Mausmodelle. Ishibashi und Mitarbeiter führten 1993 die LDL-Rezeptor-defiziente Maus ein. (Ishibashi *et al.*, 1993) Lediglich die älteren Tiere dieses Modells zeigen atherosklerotische Läsionen, wenn sie normales Nagerfutter erhalten. (Teupser *et al.*, 2003) Signifikante Gefäßveränderungen erfordern bei den LDL<sup>-/-</sup>-Knockout Mäusen die Gabe einer atherogenen Diät. (Getz and Reardon, 2012)

Die ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Maus stellt ein Tiermodell dar, welches die beiden zuvor beschriebenen Gendefekte vereint. Die Tiere weisen aufgrund des ApoE-LDL-Rezeptordefekts eine Hypercholesterinämie/Hyperlipoproteinämie auf. (Ishibashi *et al.*, 1994) Die daraus resultierenden atherosklerotischen Läsionen der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse besitzen eine bedeutende Ähnlichkeit zu humanen Gefäßwandveränderungen. (Magoori *et al.*, 2003) Selbst unter Verabreichung von gewöhnlichem Futter bilden sie diese aus und bieten somit die Möglichkeit die Atherogenese sowie antiatherosklerotische Effekte zu erforschen, ohne dass eine atherogene Diät erforderlich ist. (Getz and Reardon, 2012) Dies stellt einen Vorteil gegenüber vielen anderen Tiermodellen dar, da die Zusammensetzung eines Großteils der atherogenen Diäten (beispielsweise durch das Hinzufügen von Thiouracil) nicht den Bedingungen entspricht, die während der Atherogenese im menschlichen Organismus herrschen. Weitere positive Aspekte, welche für den Einsatz der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Maus als Atherosklerosemodell sprechen, sind die kurze Generationsdauer, die einfache und kostengünstige Tierhaltung, die Verfügbarkeit von hunderten von Inzuchtlinien sowie die gut erforschte Genetik. Zudem können die ApoE-LDL-defizienten Mäuse bereits innerhalb kurzer Zeit Gefäßwandveränderungen entwickeln. Ein häufig aufgeführter Nachteil der Maus als Atherosklerosemodell ist die geringe Größe der Arterien, welche die Evaluation der Läsionen erschwert oder in einigen Fällen unmöglich macht. Mit Hilfe neuartiger Techniken und bildgebender

Verfahren werden diese Probleme zunehmend überwunden. So eignet sich die von uns eingesetzte Mikro- und Nano-Computertomographie zur dreidimensionalen Darstellung des Gefäßsystems und der Atherosklerose bedingten Veränderungen.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse im Alter von 80 Wochen fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen der Arteria renalis ähnlich zu denen, die in der Aorta der Tiere beobachtet und beschrieben wurden.(Langheinrich *et al.*, 2006) Die Nieren der C57/BL Mäuse wiesen im Gegensatz dazu keine atherosklerotischen Veränderungen auf. Wie kürzlich berichtet erreichten dabei nahezu alle ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Tiere ein Alter von 25 Wochen. Im Gegensatz dazu überlebte lediglich ein geringer Prozentsatz der Mäuse bis zum Alter von 80 Wochen.(Langheinrich *et al.*, 2007) Grundsätzlich ist ein Überleben von Versuchsmäusen vom Wildtyp ohne zu erkranken über einige Jahre möglich. Als ursächlich für die erhöhte Mortalitätsrate der von uns eingesetzten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse könnten die atherosklerotischen Läsionen angesehen werden, welche im Vergleich zu denen von ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren wesentlich ausgeprägter sind. So finden sich im ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Maus-Modell Myokardinfarkte, während in Apolipoprotein-E-defizienten Tieren keine derartigen Ereignisse nachgewiesen werden können.(Hu *et al.*, 2005;Langheinrich *et al.*, 2007) Die Tatsache, dass diejenigen Tiere mit den am stärksten ausgeprägten atherosklerotischen Veränderungen vor Erreichen des Alters von 80 Wochen versterben, könnte unsere Untersuchungsergebnisse beeinflussen. Zur Klärung dieser Frage würde eine Längsschnittstudie beitragen.

Zusammenfassend stellt das Tiermodell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Maus jedoch eine geeignete Methode dar, um den systemischen atherosklerotischen Prozess zu verfolgen. Es bietet zudem die Möglichkeit Verfahren zu evaluieren, die das Fortschreiten beziehungsweise die Verschlimmerung von damit verbundenen Nierenveränderungen stoppen. Nichtsdestotrotz gilt es die Relevanz unserer Beobachtungen hinsichtlich humaner Erkrankungen in Zukunft zu eruieren.

#### **4.4 Atherosklerose und renale Inflammation**

Unsere Studie zeigt fortgeschrittene atherosklerotische Veränderungen der Nierenarterie sowie eine perivaskuläre Inflammation der intrarenalen Gefäße von 80 Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäusen. Bei diesen Tieren finden sich

außerdem kapilläre Aneurysmen mit Faktor VIII enthaltenden Emboli. Lediglich Arterien mit einem Durchmesser von  $> 400 \mu\text{m}$  weisen dabei atherosklerotische Läsionen auf. Gefäße mit einem Durchmesser zwischen  $150$  und  $300 \mu\text{m}$  sind umgeben von großen Ansammlungen inflammatorischer Zellen. Ähnliche Gefäßwandveränderungen wurden bereits für die intrapulmonalen Arterien in diesem Tiermodell beschrieben.(Langheinrich *et al.*, 2007) Somit könnte man annehmen, dass eine perivaskuläre Inflammation nicht zwingenderweise mit der Entwicklung einer Läsion an sich verbunden ist, sondern dass eine Assoziation mit systemischer Atherogenese und dem Gefäßdurchmesser besteht.

Im Gegensatz zu den ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäusen entwickelten die Kontrolltiere weder atherosklerotische Veränderungen noch fanden sich Vasa vasorum. Des Weiteren konnten wir keine Anzeichen für eine renale Inflammation erkennen. Dennoch beschreibt die Literatur strukturelle Gefäßveränderungen von hyperlipidämischen C57/BL Mäusen, die sich in der frühen Phase atherosklerotischer Entwicklung befinden.(Walker *et al.*, 1999)

Im Tiermodell der Ratte wurde bei parallelem Bestehen von Hypercholesterinämie und Hypertension eine erhöhte Dichte an Vasa vasorum nachgewiesen.(Kai *et al.*, 2002) Diese Studie von Kai *et al.* wirft die Frage auf, ob bei den von uns untersuchten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäusen, welche fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen in den Nierenarterien aufwiesen, zudem eine Hypertension vorlag, hervorgerufen durch eine hämodynamisch relevante Stenose der A. renalis. Der arterielle systemische Blutdruck wurde nicht bestimmt. Jedoch zeigten die ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Tiere wie bereits beschrieben eine Dickenzunahme der linksventrikulären Wand im Vergleich zu den C57/BL Mäusen.(Langheinrich *et al.*, 2006)

Die von uns untersuchten Nieren besaßen einen Anteil von 41% pathologisch veränderten Glomeruli, welche Anzeichen für eine Lipoprotein-Glomerulopathie aufwiesen. Im Rahmen dieser Nierenerkrankung, deren Pathogenese mit verschiedenen genetischen ApoE-Varianten assoziiert ist, kommt es zur Ablagerung von Lipoproteinen in den glomerulären Kapillaren.(Hoffmann *et al.*, 2001) Nachdem zunächst das ApoE-Sendai Tiermodell beschrieben wurde (Oikawa *et al.*, 1997), wurden nachfolgend weitere ApoE-Varianten bei Patienten mit Lipoprotein-Glomerulopathie identifiziert.(Konishi *et al.*, 1999;Ando *et al.*, 1999;Matsunaga *et al.*, 1999)

Die ApoE<sup>-/-</sup>-Maus entwickelt im Alter von 86 Wochen spontan eine Lipoprotein-Glomerulopathie.(Ishimura *et al.*, 2009) In der Arbeit von Ishimura *et al.* zeigen die

ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse und ApoE-Sendai-Tiere dabei einen Unterschied in der Zusammensetzung des in ihren dilatierten glomerulären Kapillaren abgelagerten Materials. Ein Zusammenhang beziehungsweise eine Verbindung zu perivaskulärer oder interstitieller Inflammation oder zu fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen der Nierenarterie wurde in dieser Studie nicht beschrieben. Demnach könnte ein pleiotroper Effekt, der verschiedene Faktoren wie das Alter, Diabetes mellitus und fortgeschrittene systemische Atherosklerose, assoziiert mit Inflammation und Hypercholesterinämie mit einbezieht, an der Entwicklung einer Lipoprotein-Glomerulopathie beteiligt sein.

## 4.5 Limitationen

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen einen Zusammenhang zwischen systemischer Atherosklerose und strukturellen Nierenveränderungen, jedoch erlauben sie keine Rückschlüsse auf Kausalität.

Die Mikro- und Nano-Computertomographie konnten in der vorgelegten Arbeit ihren Stellenwert im Rahmen der Bildgebung und Quantifizierung von Gefäß- und Weichteilstrukturen demonstrieren. Dennoch weisen auch diese Methoden entscheidende Nachteile auf. Das Messfeld und somit die Probengröße ist je nach angestrebter Auflösung auf wenige mm<sup>3</sup> beziehungsweise cm<sup>3</sup> begrenzt. Des Weiteren besteht die Notwendigkeit vor dem Scan im Mikro- oder Nano-CT Kontrastmittel zu applizieren, um eine Kontrastverstärkung und somit bessere Gewebedifferenzierung zu ermöglichen. Nur solche vaskulären Strukturen, die ausreichend mit Perfusat gefüllt und damit kontrastiert sind, können visualisiert und exakt quantifiziert werden. Die Kontrastmittelperfusion birgt somit eine potentielle Fehlerquelle. Ein zu hoher Perfusionsdruck führt zum Platzen von Kapillaren. Im Gegensatz dazu wird bei zu niedrigem Perfusionsdruck keine adäquate Gefäßfüllung erreicht.

Folglich beschränkt sich das von uns eingesetzte Verfahren auf Ex-vivo-Untersuchungen, zum einen bedingt durch das geringe Probenvolumen, zum anderen durch die Tatsache, dass das verwendete Kontrastmittel nach 20 Minuten vollständig aushärtet.

## 5 Zusammenfassung

Die ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse weisen bedeutende strukturelle Ähnlichkeiten zur humanen Atherosklerose auf. Ziel der Studie war es, die renalen Gefäße mittels hochauflösendem Mikro- und Nano-CT im Tiermodell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Maus zu quantifizieren.

Die Nieren der 80 Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse und der Kontrolltiere wurden mittels Microfil perfundiert und anschließend im Mikro- und Nano-CT (12 µm<sup>3</sup> bzw. 900 nm<sup>3</sup> Voxelgröße) untersucht. Anhand der Mikro-CT Datensätze wurde das intrarenale Gefäßvolumen bestimmt. Nach histologischer Aufarbeitung der Proben wurden zudem Anzahl, Durchmesser und Fläche der Glomeruli ermittelt.

Die Quantifizierung des renalen Gefäßbaums ergab eine signifikante Verminderung des Gefäßvolumens ( $p < 0.001$ ). Die A. renalis wies fortgeschrittene atherosklerotische Plaques mit adventitieller Neovaskularisation auf. Zudem zeigten die ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse eine perivaskuläre Inflammation. Die Gesamtanzahl der Glomeruli pro Schnittfläche nahm deutlich zu mit einem Anteil von 41% pathologisch veränderten Glomeruli. Durchmesser und Fläche der Glomeruli waren vergrößert. Nach immunhistochemischer Färbung zeigten sich außerdem kapilläre Aneurysmen gefüllt mit Faktor VIII enthaltenden Lipoprotein-Emboli in den Glomeruli.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die systemische Atherosklerose der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Mäuse mit strukturellen Veränderungen der Glomeruli und einer Verminderung des intrarenalen Gefäßvolumens einhergeht, was mittels hochauflösendem Mikro- und Nano-CT quantifiziert werden kann.



## 6 Summary

The apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-double-knockout mice are bearing considerable structural homology to human atherosclerosis. We hypothesized, that advanced atherosclerotic lesions in the renal artery are associated with kidney alterations in this animal model. The present study was designed to test the potential for quantitative imaging the renal vasculature as a marker of kidney function using high-resolution micro- and nano-CT.

Kidneys from apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-double-knockout mice at the age of 80 weeks and control animals were infused with Microfil, harvested and scanned with micro- and nano-CT (12  $\mu\text{m}^3$  and 900  $\text{nm}^3$  voxel size). The total vascular volume was quantitated using micro-CT. After histological work-up of the samples number, diameter and cross-sectional area were measured.

The quantification of the renal vasculature revealed a significant decrease of the total vascular volume ( $p < 0.001$ ). The renal artery showed advanced atherosclerotic plaques with adventitial neovascularization. Moreover, a perivascular inflammation was present in kidneys of apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-double-knockout mice. The total number of glomeruli per cross-section strikingly increased, whereas 41% of them showed pathological alterations. Glomeruli cross-sectional area and diameter were enlarged. Furthermore, immunohistochemistry demonstrated capillary aneurysms of the glomeruli filled with factor 8 containing emboli.

Our study shows that systemic atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-double-knockout mice is associated with glomeruli alterations and reduced intra-renal total vascular volume, which can be quantitated by using high-resolution micro- and nano-CT.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
Ang II	Angiotensin II
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
Apo E	Apolipoprotein E
AT1	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
Au	Gold
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BGB	Bundesgesetzbuch
CCD	Charged Coupled Device
CD3, CD20, CD138	Cluster of Differentiation 3, Cluster of Differentiation 20, Cluster of Differentiation 138
cm	Zentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
CsI	Caesiumiodid
CT	Computertomograph(ie)
°C	Grad Celsius
d	Schichtdicke
dl	Deziliter
EGF	Epidermal growth factor
et al	et alii/ et aliae, Lateinisch für „und andere“
Fc	Fragment crystallisable
FOV	field of view
Gz	Geschäftszeichen

HDL	High Density Lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
IE	Internationale Einheit
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IGF-1	Insulin-like-Growth Factor-1
IL-1	Interleukin-1
Kcal	Kilokalorie
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
LaB6	Lanthanhexaborid
LDL	Low Density Lipoprotein
MB	Megabyte
MCP-1	Monocyte chemoattractant Protein-1
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
MJ	Megajoule
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MR	Magnetresonanz
MW	Mittelwert
$\mu$ A	Mikroampere
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ m <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid

nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
NZW	New Zealand White
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrit-Anion
p	Signifikanz
PAS	Periodic acid-Schiff
PC	Personal Computer
PDGF	Platelet-derived growth factor
RAM	Random-Access Memory
S.	Seite
s	Sekunde
SEM	standard error of the mean
SPF	Specific Pathogen Free Facility
SMC	Smooth Muscle Cells
TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor-alpha, Transforming Growth Factor-beta
TI	Thallium
TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$	Tumor Nekrose Faktor-alpha, Tumor Nekrose Faktor-beta
TTV	Total Vascular Volume
V.	Vena
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
vs.	versus
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell
Vv.	Venae
VIII-RAG	Faktor VIII-assoziiertes Antigen
W	Watt

WHHL

Watanabe-Heritable-Hyperlipidemic

z.B.

zum Beispiel

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des makroskopischen Aufbaus der Niere. ....	2
Abbildung 2:	Schematische Abbildung eines Nephrons mit Gefäßarchitektur. ....	3
Abbildung 3:	Pathogenese der Atherosklerose. ....	6-7
Abbildung 4:	Schematische Darstellung eines Mikro-CT-Scanners mit Kegelstrahlgeometrie. ....	12
Abbildung 5:	Parallelstrahlgeometrie bei Synchrotronstrahlungsquelle. ....	12
Abbildung 6:	Makroskopische Aufnahmen der Nieren einer C57/BL Maus und einer ApoE <sup>-/-</sup> /LDL <sup>-/-</sup> -Doppel-Knockout Maus nach Perfusion mittels Microfil und Einbettung in Paraffin. ....	22
Abbildung 7:	Quantifizierung der histologischen Schnitte der ApoE <sup>-/-</sup> /LDL <sup>-/-</sup> -Doppel-Knockout Mäuse und der Kontrolltiere. ....	23
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der APAAP-Methode. ....	25
Abbildung 9:	Histologische Aufnahmen der A. renalis der ApoE <sup>-/-</sup> /LDL <sup>-/-</sup> -Doppel-Knockout Maus mit konzentrischen atherosklerotischen Plaques, sowie Plaquerupturen und Vasa Vasorum in der Adventitia mit einer Ansammlung von Entzündungszellen. ....	28
Abbildung 10:	Histologische Aufnahme des Nierenparenchyms einer ApoE <sup>-/-</sup> /LDL <sup>-/-</sup> -Doppel-Knockout Maus mit perivaskulärer Inflammation und pathologisch veränderten Glomeruli. ....	29
Abbildung 11:	Immunhistochemische Färbung des Nierenparenchyms der ApoE <sup>-/-</sup> /LDL <sup>-/-</sup> -Doppel-Knockout Mäuse mit perivaskulären Ansammlungen von Entzündungszellen. ....	30
Abbildung 12:	Immunhistochemische Färbung der Glomeruli der ApoE <sup>-/-</sup> /LDL <sup>-/-</sup> -Doppel-Knockout Tiere mit kapillären Aneurysmen. ....	31

Abbildung 13: Vergleich der Anzahl von Glomeruli pro Schnittfläche in den Nieren der Kontrolltiere und der ApoE <sup>-/-</sup> /LDL <sup>-/-</sup> -Doppel-Knockout Mäuse. ....	32
Abbildung 14: Histologische Schnitte der Nieren der ApoE <sup>-/-</sup> /LDL <sup>-/-</sup> -Doppel-Knockout Tiere mit Anzeichen einer Lipoprotein assoziierten Glomerulopathie im Bereich des Kortex und der kortikomedullären Junktionszone. ....	33
Abbildung 15: Histologische Schnitte der Glomeruli der ApoE <sup>-/-</sup> /LDL <sup>-/-</sup> -Doppel-Knockout Tiere. ....	34
Abbildung 16: Vergleich der Fläche der Glomeruli von ApoE <sup>-/-</sup> /LDL <sup>-/-</sup> -Doppel-Knockout Mäusen und C57 Kontrolltieren. ....	35
Abbildung 17: Vergleich des Kapillardurchmessers der Glomeruli von ApoE <sup>-/-</sup> /LDL <sup>-/-</sup> -Doppel-Knockout Mäusen und C57 Kontrolltieren. ....	36
Abbildung 18: Vergleich des intrarenalen Gefäßvolumens von ApoE <sup>-/-</sup> /LDL <sup>-/-</sup> -Doppel-Knockout Mäusen und C57 Kontrollmäusen. ....	37
Abbildung 19: Mikro- und Nano-CT-Aufnahmen der Niere der ApoE <sup>-/-</sup> /LDL <sup>-/-</sup> -Doppel-Knockout Maus mit reduziertem intrarenalen Gefäßvolumen, sowie inhomogenem Verzweigungsmuster und luminalen Einengungen der Gefäße. ....	38

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristische Merkmale eines Ganzkörper-Spiral-CT-Scanners im Vergleich mit einem Mikro-Computertomographen. ....	15
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## 9 Literaturverzeichnis

1958. CLASSIFICATION of atherosclerotic lesions; report of a study group. World Health Organ Tech Rep Ser 57:1-20.

ACHENBACH S, 2003. Clinical Use of Multi-Slice CT Coronary Angiography. Herz 28(2):119-125.

ALIEV G, BURNSTOCK G, 1998. Watanabe rabbits with heritable hypercholesterolaemia: a model of atherosclerosis. Histol Histopathol 13:797-817.

AMANN K, TYRALLA K, GROSS ML, EIFERT T, ADAMCZAK M, RITZ E, 2003. Special characteristics of atherosclerosis in chronic renal failure. Clin Nephrol 60 Suppl 1:S13-S21.

AMANN K, WANNER C, RITZ E, 2006. Cross-talk between the kidney and the cardiovascular system. J Am Soc Nephrol 17:2112-2119.

AMBROSE J, 1973. Computerized transverse axial scanning (tomography). 2. Clinical application. Br J Radiol 46:1023-1047.

ANDO M, SASAKI J, HUA H, MATSUNAGA A, UCHIDA K, JOU K, OIKAWA S, SAITO T, NIHEI H, 1999. A novel 18-amino acid deletion in apolipoprotein E associated with lipoprotein glomerulopathy. Kidney Int 56:1317-1323.

ANDRUS SB, MANN GV, 1956. Xanthomatosis and atherosclerosis produced by diet in an adult rhesus monkey. J Lab Clin Med 48:533-550.

ANITSCHKOW N, 1913. Über die Veränderung der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. Beitr Pathol Anat 56:379-404.

ARAD Y, BADIMON JJ, BADIMON L, HEMBREE WC, GINSBERG HN, 1989. Dehydroepiandrosterone feeding prevents aortic fatty streak formation and cholesterol accumulation in cholesterol-fed rabbit. Arteriosclerosis 9:159-166.

ATTMAN PO, SAMUELSSON O, 2009. Dyslipidemia of kidney disease. Curr Opin Lipidol 20:293-299.

BADIMON L, 2001. Atherosclerosis and thrombosis: lessons from animal models. Thromb Haemost 86:356-365.

BAGDADE JD, PORTE D, JR., BIERMAN EL, 1968. Hypertriglyceridemia. A metabolic consequence of chronic renal failure. N Engl J Med 279:181-185.

BAHOUS SA, BLACHER J, SAFAR ME, 2009. Aortic stiffness, kidney disease, and renal transplantation. Curr Hypertens Rep 11:98-103.



BALTO K, MÜLLER R, CARRINGTON DC, DOBECK J, STASHENKO P, 2000. Quantification of periapical bone destruction in mice by micro-computed tomography. J Dent Res 79(1):35-40.

BARNES SE, WEINBERG PD, 1999. Two patterns of lipid deposition in the cholesterol-fed rabbit. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19:2376-2386.

BECKMANN EC, 2006. CT scanning the early days. Br J Radiol 79:5-8.

BENNINGHOFF, DRENCKHAHN, 2008. Nieren. In: *Anatomie, Band 1: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. München;Jena: Urban & Fischer Verlag, 758-784.

BENTLEY MD, RODRIGUEZ-PORCEL M, LERMAN A, SARAFOV MH, ROMERO JC, PELAEZ LI, GRANDE JP, RITMAN EL, LERMAN LO, 2002. Enhanced renal cortical vascularization in experimental hypercholesterolemia. Kidney Int 61:1056-1063.

BENVENISTE H, BLACKBAND S, 2002. MR microscopy and high resolution small animal MRI: applications in neuroscience research. Prog Neurobiol. 67(5):393-420.

BONTHU S, HEISTAD DD, CHAPPELL DA, LAMPING KG, FARACI FM, 1997. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17:2333-2340.

BRASEN JH, NIENDORF A, 1997. [Atherosclerosis. Formal pathogenesis, classification and functional significance]. Pathologe 18:218-227.

BRESLOW JL, 1993. Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A 90:8314-8318.

BRINKMANN A, MORITZ R, SCHNECK E, KLINE T, EAKER DR, VON GERLACH S, BOHLE RM, LANGHEINRICH AC, LERMAN LO, RITMAN EL, 2011. 3-Dimensional Structural and Volumetric Analysis of Glomeruli in Porcine Kidneys with Renal Artery Stenosis using Nano-Computed Tomography. Rofo 183(S01).

BURKE AP, FARB A, MALCOM GT, LIANG YH, SMIALEK J, VIRMANI R, 1997. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. N Engl J Med 336:1276-1282.

BURSTEIN P, BJÖRKHOLM PJ, CHASE RC, SEGUIN FH, 1984. The largest and smallest X-ray computed tomography systems. Nucl Instrum Methods Phys Res 221:207-212.

BUTKUS A, EHRHART LA, MCCULLAGH KG, 1976. Plasma and aortic lipids in experimental canine atherosclerosis. Exp Mol Pathol 25:152-162.

CHADE AR, BENTLEY MD, ZHU X, RODRIGUEZ-PORCEL M, NIERMEYER S, AMORES-ARRIAGA B, NAPOLI C, RITMAN EL, LERMAN A, LERMAN LO, 2004.

Antioxidant intervention prevents renal neovascularization in hypercholesterolemic pigs. *J Am Soc Nephrol* 15: 1816–1825.

CHADE AR, LERMAN A, LERMAN LO, 2005. Kidney in early atherosclerosis. *Hypertension* 45:1042-1049.

CNUUDE V, MASSCHAELE B, DIERICK M, VLASSENBROECK J, VAN HOOREBEKE L, JACOBS P, 2006. Recent progress in X-ray CT as a geosciences tool. *Geochemistry* 21:826-832.

CORDELL JL, FALINI B, ERBER WN, GHOSH AK, ABDULAZIZ Z, MACDONALD S, PULFORD KA, STEIN H, MASON DY, 1984. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32:219-229.

CULLEN P, BAETTA R, BELLOSTA S, BERNINI F, CHINETTI G, CIGNARELLA A, VON EA, EXLEY A, GODDARD M, HOFKER M, HURT-CAMEJO E, KANTERS E, KOVANEN P, LORKOWSKI S, MCPHEAT W, PENTIKAINEN M, RAUTERBERG J, RITCHIE A, STAELS B, WEITKAMP B, DE WM, 2003. Rupture of the atherosclerotic plaque: does a good animal model exist? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:535-542.

DAWBER TR, 1960. Summary of recent literature regarding cigarette smoking and coronary heart disease. *Circulation* 22:164-166.

DE CLERCK NM, MEURRENS K, WEILER H, VAN DYCK D, VANHOUTTE G, TERPSTRA P, POSTNOV AA, 2004. High-Resolution X-ray Microtomography for the Detection of Lung Tumors in Living Mice. *Neoplasia* 6(4): 374–379.

DE SMET BJ, VAN DER ZJ, VAN DER HELM YJ, KUNTZ RE, BORST C, POST MJ, 1998. The atherosclerotic Yucatan animal model to study the arterial response after balloon angioplasty: the natural history of remodeling. *Cardiovasc Res* 39:224-232.

DULAU-FLOREA I, FRANKE J, MANN J, 2003. [Moderate renal failure: a significant cardiovascular risk factor]. *Dtsch Med Wochenschr* 128:1247-1251.

DZAU VJ, BRAUN-DULLAEUS RC, SEDDING DG, 2002. Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 8(11):1249-1256.

ELLIOTT JC, DOVER SD, 1982. X-ray microtomography. *J Microsc* 126:211-213.

ENDEMANN DH, SCHIFFRIN EL, 2004. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 15:1983-1992.

ENGELKE K, KAROLCZAK M, LUTZ A, SEIBERT U, SCHALLER S, KALENDER W, 1999. [Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure]. *Radiologe* 39:203-212.

FALK E, 2006. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 47:C7-12.

- FALK E, 1992. Why do plaques rupture? *Circulation* 86:III30-III42.
- FALK E, SHAH PK, FUSTER V, 1995. Coronary plaque disruption. *Circulation* 92:657-671.
- FASSETT RG, D'INTINI V, HEALY H, GOWARDMAN J, GAN JS, SHARMAN JE, COOMBES JS, 2009. Assessment of arterial stiffness, oxidative stress and inflammation in acute kidney injury. *BMC Nephrol* 10:15.
- FELDKAMP LA, 1984. Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Amer* 1:612-619.
- FINET G, CACHARD C, DELACHARTRE P, MAURINCOMME E, BEAUNE J, 1998. Artifacts in intravascular ultrasound imaging during coronary artery stent implantation. *Ultrasound Med Biol* 24(6):793-802.
- FINK C, EICHHORN J, KIESSLING F, BOCK M, DELORME S, 2003. Time-resolved multiphasic 3D MR angiography in the diagnosis of the pulmonary vascular system in children. *Rofo* 175(7):929-935.
- FLANNERY BP, DECKMAN HW, ROBERGE WG, D'AMICO KL, 1987. Three-Dimensional X-ray Microtomography. *Science* 237:1439-1444.
- FORTEPIANI LA, RUIZ MC, PASSARDI F, BENTLEY MD, GARCIA-ESTAN J, RITMAN EL, ROMERO JC, 2003. Effect of losartan on renal microvasculature during chronic inhibition of nitric oxide visualized by micro-CT. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F852-F860.
- FREDERIK PM, VAN DOORN LG, 1973. A technique for perfusion of rat testes in situ through the internal spermatic arteries. *J Reprod Fertil* 35(1):117-121.
- FUSTER V, LIE JT, BADIMON L, ROSEMARK JA, BADIMON JJ, BOWIE EJ, 1985. Spontaneous and diet-induced coronary atherosclerosis in normal swine and swine with von Willebrand disease. *Arteriosclerosis* 5:67-73.
- GADE R, 1977. Microangiography in the perfusion-fixed rabbit kidney: a single injection technique for the study of the nephron. *Invest radiol* 12(4):348-352.
- GARCIA-SANZ A, RODRIGUEZ-BARBERO A, BENTLEY MD, RITMAN EL, ROMERO JC, 1998. Three-dimensional microcomputed tomography of renal vasculature in rats. *Hypertension* 31:440-444.
- GEBBERS JO, 2007. Atherosclerosis, cholesterol, nutrition, and statins--a critical review. *Ger Med Sci* 5:Doc04.
- GETZ GS, REARDON CA, 2012. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:1104-15.
- GO AS, CHERTOW GM, FAN D, MCCULLOCH CE, HSU CY, 2004. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 351:1296-1305.

GOSSL M, MALYAR NM, ROSOL M, BEIGHLEY PE, RITMAN EL, 2003. Impact of coronary vasa vasorum functional structure on coronary vessel wall perfusion distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H2019-H2026.

GRUNDMANN R, RAAB M, MEUSEL E, KIRCHHOFF R, PICHLMAIER H, 1974. The flow distribution in the hypothermic perfused kidney visualised by silicon rubber injection. *Langenbecks Arch Chir* 336(3):195-206.

HANSSON GK, 1993. Immune and inflammatory mechanisms in the development of atherosclerosis. *Br Heart J* 69:S38-S41.

HENRY RM, KOSTENSE PJ, BOS G, DEKKER JM, NIJPELS G, HEINE RJ, BOUTER LM, STEHOUWER CD, 2002. Mild renal insufficiency is associated with increased cardiovascular mortality: The Hoorn Study. *Kidney Int* 62:1402-1407.

HERRERA VL, MAKRIDES SC, XIE HX, ADARI H, KRAUSS RM, RYAN US, RUIZ-OPAZO N, 1999. Spontaneous combined hyperlipidemia, coronary heart disease and decreased survival in Dahl salt-sensitive hypertensive rats transgenic for human cholesteryl ester transfer protein. *Nat Med* 5:1383-9.

HERZOG CA, MA JZ, COLLINS AJ, 1998. Poor long-term survival after acute myocardial infarction among patients on long-term dialysis. *N Engl J Med* 339:799-805.

HOFFMANN M, SCHARNAGL H, PANAGIOTOU E, BANGHARD W, WIELAND H, MARZ W, 2001. Diminished LDL receptor and high heparin binding of apolipoprotein E2 Sendai associated with lipoprotein glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 12:524-530.

HOUNSFIELD GN, 1973. Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system. *Br J Radiol* 46:1016-1022.

HU W, POLINSKY P, SADOON E, ROSENFELD ME, SCHWARTZ SM, 2005. Atherosclerotic lesions in the common coronary arteries of ApoE knockout mice. *Cardiovasc Pathol* 14:120-125.

ISHIBASHI S, BROWN MS, GOLDSTEIN JL, GERARD RD, HAMMER RE, HERZ J, 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92:883-93.

ISHIBASHI S, HERZ J, MAEDA N, GOLDSTEIN JL, BROWN MS, 1994. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4431-4435.

ISHIMURA A, WATANABE M, NAKASHIMA H, ITO K, MIYAKE K, MOCHIZUKI S, ISHIGAKI Y, SAITO T, 2009. Lipoprotein glomerulopathy induced by ApoE-Sendai is different from glomerular lesions in aged apoE-deficient mice. *Clin Exp Nephrol* 13:430-437.

ITO H, UEHARA K, MATSUMOTO Y, HASHIMOTO A, NAGANO C, NIIMI M, MIYAKODA G, NAGANO K, 2012. Cilostazol inhibits accumulation of triglyceride in aorta and platelet aggregation in cholesterol-fed rabbits. PLoS One 7:e39374.

JAWIEN J, NASTALEK P, KORBUT R, 2004. Mouse models of experimental atherosclerosis. J Physiol Pharmacol 55:503-517.

JOKINEN MP, CLARKSON TB, PRICHARD RW, 1985. Animal models in atherosclerosis research. Exp Mol Pathol 42:1-28.

JORGENSEN SM, DEMIRKAYA O, RITMAN EL, 1998. Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT. Am J Physiol 275:H1103-H1114.

JORIS I, ZAND T, NUNNARI JJ, KROLIKOWSKI FJ, MAJNO G, 1983. Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats. Am J Physiol 113:341-58.

JUNQUEIRA LCU, CARNEIRA J, 2005. Harnorgane.In: *Histologie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 319-340.

KAI H, KUWAHARA F, TOKUDA K, SHIBATA R, KUSABA K, NIIYAMA H, TAHARA N, NAGATA T, IMAIZUMI T, 2002. Coexistence of hypercholesterolemia and hypertension impairs adventitial vascularization. Hypertension 39:455-459.

KAMPSCHULTE M, BRINKMANN A, STIEGER P, SEDDING DG, DIERKES C, BOHLE RM, KROMBACH G, RITMAN EL, LANGHEINRICH AC, 2010. Quantitative CT imaging of the spatio-temporal distribution patterns of vasa vasorum in aortas of apoE-/-/LDL-/- double knockout mice. Atherosclerosis 212:444-450.

KANNEL WB, DAWBER TR, KAGAN A, REVOTSKIE N, STOKES J, III, 1961. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. Ann Intern Med 55:33-50.

KANTOR B, KWON HM, RITMAN EL, HOLMES DR, SCHWARTZ RS, 1999. Images in Cardiology Imaging the coronary microcirculation: 3D micro-CT of coronary vasa vasorum. Int J Cardiovasc Intervent 2:79.

KAPADIA RD, STROUP GB, BADGER AM, KOLLER B, LEVIN JM, COATNEY RW, DODDS RA, LIANG X, LARK MW, GOWEN M, 1998. Applications of micro-CT and MR microscopy to study pre-clinical models of osteoporosis and osteoarthritis. Technol Health Care 6:361-372.

KAPLAN JR, ADAMS MR, CLARKSON TB, MANUCK SB, SHIVELY CA, WILLIAMS JK, 1996. Psychosocial factors, sex differences, and atherosclerosis: lessons from animal models. Psychosom Med 58:598-611.

KARAU KL, JOHNSON RH, MOLTHEN RC, DHYANI AH, HAWORTH ST, HANGER CC, ROERIG DL, DAWSON CA, 2001a. Microfocal X-ray CT imaging and pulmonary

arterial distensibility in excised rat lungs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H1447-H1457.

KARAU KL, MOLTHEN RC, DHYANI A, HAWORTH ST, HANGER CC, ROERIG DL, JOHNSON RH, DAWSON CA, 2001b. Pulmonary arterial morphometry from microfocal X-ray computed tomography. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H2747-H2756.

KAYSEN GA, EISERICH JP, 2004. The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 15:538-548.

KENCHIAIAH S, EVANS JC, LEVY D, WILSON PW, BENJAMIN EJ, LARSON MG, KANNEL WB, VASAN RS, 2002. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 347:305-313.

KINNEY JH, RYABY JT, HAUPT DL, LANE NE, 1998. Three-dimensional in vivo morphometry of trabecular bone in the OVX rat model of osteoporosis. *Technol Health Care* 6(5-6):339-350.

KITA T, BROWN MS, WATANABE Y, GOLDSTEIN JL, 1981. Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:2268-2272.

KOBAYASHI T, ITO T, SHIOMI M, 2011. Roles of the WHHL rabbit in translational research on hypercholesterolemia and cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol* 2011:406473.

KONISHI K, SARUTA T, KURAMOCHI S, OIKAWA S, SAITO T, HAN H, MATSUNAGA A, SASAKI J, 1999. Association of a novel 3-amino acid deletion mutation of apolipoprotein E (Apo E Tokyo) with lipoprotein glomerulopathy. *Nephron* 83:214-218.

KRATKY RG, ZEINDLER CM, LO DK, ROACH MR, 1989. Quantitative measurement from vascular casts. *Scanning microsc* 3(3):937-943.

KRISTENSEN SD, ANDERSEN HR, FALK E, 1999. What an interventional cardiologist should know about the pathophysiology of acute myocardial infarction. *Semin Interv Cardiol* 4:11-16.

KUSUMI Y, SCANU AM, MCGILL HC, WISSLER RW, 1993. Atherosclerosis in a rhesus monkey with genetic hypercholesterolemia and elevated plasma Lp(a). *Atherosclerosis* 99:165-174.

KWON HM, SANGIORGI G, RITMAN EL, MCKENNA C, HOLMES DR, JR., SCHWARTZ RS, LERMAN A, 1998. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 101:1551-1556.

LAFONT A, FAXON D, 1998. Why do animal models of post-angioplasty restenosis sometimes poorly predict the outcome of clinical trials? *Cardiovasc Res* 39:50-59.

LANGHEINRICH AC, BOHLE RM, 2005. Atherosclerosis: humoral and cellular factors of inflammation. *Virchows Arch* 446:101-111.

LANGHEINRICH AC, BOHLE RM, BREITHECKER A, LOMMEL D, RAU WS, 2004a. [Micro-computed tomography of the vasculature in parenchymal organs and lung alveoli]. *Rofo* 176:1219-1225.

LANGHEINRICH AC, BOHLE RM, GRESCHUS S, HACKSTEIN N, WALKER G, VON GS, RAU WS, HOLSCHEMANN H, 2004b. Atherosclerotic lesions at micro CT: feasibility for analysis of coronary artery wall in autopsy specimens. *Radiology* 231:675-681.

LANGHEINRICH AC, MICHNIEWICZ A, BOHLE RM, RITMAN EL, 2007. Vasa vasorum neovascularization and lesion distribution among different vascular beds in ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice. *Atherosclerosis* 191:73-81.

LANGHEINRICH AC, MICHNIEWICZ A, SEDDING DG, WALKER G, BEIGHLEY PE, RAU WS, BOHLE RM, RITMAN EL, 2006. Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoprotein E<sup>(-/-)</sup>/low-density lipoprotein<sup>(-/-)</sup> double knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:347-352.

LANGHEINRICH AC, YENIGUEN M, OSTENDORF A, MARHOFFER S, KAMPSCHULTE M, BACHMANN G, STOLZ E, GERRIETS T, 2010. Evaluation of the middle cerebral artery occlusion techniques in the rat by in-vitro 3-dimensional micro- and nano computed tomography. *BMC Neurol* 10:36.

LERMAN A, RITMAN EL, 1999. Evaluation of microvascular anatomy by micro-CT. *Herz* 24:531-533.

LI X, LIU Y, ZHANG H, REN L, LI Q, LI N, 2011. Animal models for the atherosclerosis research: a review. *Protein & Cell* 2:189-201.

LITTLE WC, 1990. Angiographic assessment of the culprit coronary artery lesion before acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 66:44G-47G.

LU XT, LIU YF, ZHANG L, YANG RX, LIU XQ, YAN FF, WANG YB, BAI WW, ZHAO YX, JIANG F, 2012. Unpredictable chronic mild stress promotes atherosclerosis in high cholesterol-fed rabbits. *Psychosom Med* 74:604-611.

MAEHARA N, 2003. Experimental microcomputed tomography study of the 3D microangioarchitecture of tumors. *Eur Radiol* 13:1559-1565.

MAGOORI K, KANG MJ, ITO MR, KAKUUCHI H, IOKA RX, KAMATAKI A, KIM DH, ASABA H, IWASAKI S, TAKEI YA, SASAKI M, USUI S, OKAZAKI M, TAKAHASHI S, ONO M, NOSE M, SAKAI J, FUJINO T, YAMAMOTO TT, 2003. Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E. *J Biol Chem* 278:11331-11336.



MAHLEY RW, WEISGRABER KH, INNERARITY T, 1974. Canine lipoproteins and atherosclerosis. II. Characterization of the plasma lipoproteins associated with atherogenic and nonatherogenic hyperlipidemia. *Circ Res* 35:722-733.

MALINOW MR, MARUFFO CA, 1965. Aortic atherosclerosis in free-ranging howler monkeys (*Alouatta caraya*). *Nature* 206:948-949.

MATSUNAGA A, SASAKI J, KOMATSU T, KANATSU K, TSUJI E, MORIYAMA K, KOGA T, ARAKAWA K, OIKAWA S, SAITO T, KITA T, DOI T, 1999. A novel apolipoprotein E mutation, E2 (Arg25Cys), in lipoprotein glomerulopathy. *Kidney Int* 56:421-427.

MONDY JS, WILLIAMS JK, ADAMS MR, DEAN RH, GEARY RL, 1997. Structural determinants of lumen narrowing after angioplasty in atherosclerotic nonhuman primates. *J Vasc Surg* 26:875-883.

MOS C, HOLT G, IUHASZ S, MOS D, TEODOR I, HALBAC M, 2010. The sensitivity of transabdominal ultrasound in the diagnosis of ureterolithiasis. *Med Ultrason* 12:188-197.

MULLER DW, ELLIS SG, TOPOL EJ, 1992. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 19:418-432.

MUNRO JM, VAN DER WALT JD, MUNRO CS, CHALMERS JA, COX EL, 1987. An immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks. *Hum Pathol* 18:375-380.

NAKASHIMA Y, PLUMP AS, RAINES EW, BRESLOW JL, ROSS R, 1994. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14:133-40.

NETTUM JA, 1995. Combined vascular-bronchoalveolar casting using formalin-fixed canine lungs and a low viscosity silicone rubber. *Anat rec* 243(4):479-482.

NIETO FJ, 1999. Cardiovascular disease and risk factor epidemiology: a look back at the epidemic of the 20th century. *Am J Public Health* 89:292-294.

NISHINA PM, VERSTUYFT J, PAIGEN B, 1990. Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. *J Lipid Res* 31:859-69.

NISSEN SE, YOCK PG, 2001. Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical applications. *Circulation* 103(4):604-616.

OIKAWA S, MATSUNAGA A, SAITO T, SATO H, SEKI T, HOSHI K, HAYASAKA K, KOTAKE H, MIDORIKAWA H, SEKIKAWA A, HARA S, ABE K, TOYOTA T, JINGAMI H, NAKAMURA H, SASAKI J, 1997. Apolipoprotein E Sendai (arginine 145-->proline): a new variant associated with lipoprotein glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 8:820-823.

ORTIZ MC, GARCIA-SANZ A, BENTLEY MD, FORTEPIANI LA, GARCIA-ESTAN J, RITMAN EL, ROMERO JC, JUNCOS LA, 2000. Microcomputed tomography of kidneys following chronic bile duct ligation. *Kidney Int* 58:1632-1640.

PAIGEN B, MORROW A, BRANDON C, MITCHELL D, HOLMES P, 1985. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 57:65-73.

PATHOBIOLOGICAL DETERMINANTS OF ATHEROSCLEROSIS IN YOUTH (PDAY) RESEARCH GROUP, 1990. Relationship of atherosclerosis in young men to serum lipoprotein cholesterol concentrations and smoking. A preliminary report from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *JAMA* 264:3018-3024.

PERSY V, POSTNOV A, NEVEN E, DAMS G, DE BROE M, D'HAESE P, DE CLERCK N, 2006. High-resolution X-ray microtomography is a sensitive method to detect vascular calcification in living rats with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(9):2110-2116.

PIEDRAHITA JA, ZHANG SH, HAGAMAN JR, OLIVER PM, MAEDA N, 1992. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4471-5.

PIPER W, 2007. Krankheiten der Nieren und ableitenden Harnwege. In: *Innere Medizin*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 259-261.

PLUMP AS, SMITH JD, HAYEK T, AALTO-SETÄLÄ K, WALSH A, VERSTUYFT JG, RUBIN EM, BRESLOW JL, 1992. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71:343-53.

POMPOSELLI F, 2010. Arterial imaging in patients with lower-extremity ischemia and diabetes mellitus. *J Am Podiatr Med Assoc* 100(5):412-423.

POSTNOV AA, MEURRENS K, WEILER H, VAN DYCK D, XU H, TERPSTRA P, DE CLERCK NM, 2005. In vivo assessment of emphysema in mice by high resolution X-ray microtomography. *J Microsc* 220(Pt 1):70-75.

REDDICK RL, ZHANG SH, MAEDA N, 1994. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 14:141-147.

RICHARDSON M, SCHMIDT AM, GRAHAM SE, ACHEN B, DERESKE M, RUSSELL JC, 1998. Vasculopathy and insulin resistance in the JCR:LA-cp rat. *Atherosclerosis* 138:135-46.

RIDKER PM, STAMPFER MJ, RIFAI N, 2001. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* 285:2481-2485.

RITMAN EL, 2004. Micro-computed tomography-current status and developments. *Annu Rev Biomed Eng* 6:185-208.

RITMAN EL, BOLANDER ME, FITZPATRICK LA, TURNER RT, 1998. Micro-CT imaging of structure-to-function relationship of bone microstructure and associated vascular involvement. *Technol Health Care* 6(5-6):403-412.

ROBERS D, BAUM U, POHLE et al., 2003. Detection of coronary artery stenoses with thin-slice multi-detector row spiral computed tomography and multiplanar reconstruction. *Circulation* 107(5):664-666.

ROSS R, 1999. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138:S419-S420.

ROSS R, 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809.

ROTH H, 2006. Computertomographie in der Elektronik. *Elektronik und Entwicklung* 5:62-64.

ROZANSKI A, BLUMENTHAL JA, KAPLAN J, 1999. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation* 99:2192-2217.

RUEGSEGG P, KOLLER B, MULLER R, 1996. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int* 58:24-29.

RUSSELL JC, GRAHAM SE, RICHARDSON M, 1998. Cardiovascular disease in the JCR:LA-cp rat. *Mol Cell Biochem* 188:113-26.

RUSSELL JC, KOESLAG DG, DOLPHIN PJ, AMY RM, 1993. Beneficial effects of acarbose in the atherosclerosis-prone JCR:LA-corpulent rat. *Metabolism* 42:218-23.

SATO T, IKEDA O, YAMAKOSHI Y, TSUBOUCHI M, 1981. X-ray tomography for microstructural objects. *Appl Opt* 20:3880-3883.

SCANU AM, KHALIL A, NEVEN L, TIDORE M, DAWSON G, PFAFFINGER D, JACKSON E, CAREY KD, MCGILL HC, FLESS GM, 1988. Genetically determined hypercholesterolemia in a rhesus monkey family due to a deficiency of the LDL receptor. *J Lipid Res* 29:1671-1681.

SCHIEBLER TH, KORF HW, 2007. Harnorgane. In: *Anatomie Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. Steinkopff Verlag, 387-397.

SCHIELE F, 2009. Renal dysfunction and coronary disease: a high-risk combination. *J Nephrol* 22:39-45.

SCHIFFRIN EL, LIPMAN ML, MANN JF, 2007. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* 116:85-97.

SCHMIDT RF, LANG F, 2007. Niere.In: *Physiologie des Menschen*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 683-687.

SCHOTH F, PERSIGHEHL T, PALMOWSKI M, 2010. Current role and future perspective of MRI for diagnosis and characterization of renal cell carcinoma. *Panminerva Med* 52:307-318.

SHIBATA T, NAGANO T, 1996. Applying very high resolution microfocus X-ray CT and 3-D reconstruction to the human auditory apparatus. *Nat Med* 2(8):933-935.

SIMOPOULOS DN, GIBBONS SJ, MALYSZ J, SZURSZEWSKI JH, FARRUGIA G, RITMAN EL, MORELAND RB, NEHRA A, 2001. Corporeal structural and vascular micro architecture with X-ray micro computerized tomography in normal and diabetic rabbits: histopathological correlation. *J Urol* 165:1776-1782.

STARY HC, MALINOW MR, 1982. Ultrastructure of experimental coronary artery atherosclerosis in cynomolgus macaques. A comparison with the lesions of other primates. *Atherosclerosis* 43:151-175.

ST JOHN LC, BELL FP, 1991. Arterial lipid biochemistry in the spontaneously hyperlipidemic Zucker rat and its similarity to early atherogenesis. *Atherosclerosis* 86:139-44.

TANG GL, CHIN J, KIBBE MR, 2010. Advances in diagnostic imaging for peripheral arterial disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 8(10):1447-1455.

TANZAWA K, SHIMADA Y, KURODA M, TSUJITA Y, ARAI M, WATANABE H, 1980. WHHL-rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *FEBS Lett* 118:81-84.

TEUPSER D, PERSKY AD, BRESLOW JL, 2003. Induction of atherosclerosis by low-fat, semisynthetic diets in LDL receptor-deficient C57BL/6J and FVB/NJ mice: comparison of lesions of the aortic root, brachiocephalic artery, and whole aorta (en face measurement). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1907-13.

TODD ME, MCDEVITT E, GOLDSMITH EI, 1972. Blood-clotting mechanisms of nonhuman primates. Choice of the baboon model to simulate man. *J Med Primatol* 1:132-141.

TOYOTA E, OGASAWARA Y, FUJIMOTO K, KAJITA T, SHIGETO F, ASANO T, WATANABE N, KAJIYA F, 2004. Global heterogeneity of glomerular volume distribution in early diabetic nephropathy. *Kidney Int* 66(2):855-861.

TONELLI M, WIEBE N, CULLETON B, HOUSE A, RABBAT C, FOK M, MCALISTER F, GARG AX, 2006. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol* 17:2034-2047.

TREVISAN R, DODESINI AR, LEPORE G, 2006. Lipids and renal disease. J Am Soc Nephrol 17:S145-S147.

VILAHUR G, PADRO T, BADIMON L, 2011. Atherosclerosis and thrombosis: insights from large animal models. J Biomed Biotechnol 2011:907575.

WALKER G, LANGHEINRICH AC, DENNHAUSER E, BOHLE RM, DREYER T, KREUZER J, TILLMANNS H, BRAUN-DULLAEUS RC, HABERBOSCH W, 1999. 3-deazaadenosine prevents adhesion molecule expression and atherosclerotic lesion formation in the aortas of C57BL/6J mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19:2673-2679.

WAN SY, KIRALY AP, RITMAN EL, HIGGINS WE, 2000. Extraction of the hepatic vasculature in rats using 3-D micro-CT images. IEEE Trans Med Imaging 19:964-971.

WAN SY, RITMAN EL, HIGGINS WE, 2002. Multi-generational analysis and visualization of the vascular tree in 3D micro-CT images. Comput Biol Med 32:55-71.

WATANABE Y, 1980. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). Atherosclerosis 36:261-268.

WELSCH U, DELLER T, 2010. Harnorgane. In: *Lehrbuch Histologie*. München: Urban & Fischer Verlag, 383-398.

WIESNER W, PFAMMATTER T, KRESTIN GP, DEBATIN JF, 1998. The MRT and MRA of kidney transplants- vascular and perfusion assessment. Rofo 169:290-296.

WON YY, CHUNG YS, PARK YK, YOO VY, 2003. Correlations between microcomputed tomography and bone histomorphometry in Korean young females. Yonsei Med J 44(5):811-815.

YANNI AE, 2004. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. Lab Anim 38:246-256.

ZHU XY, CHADE AR, RODRIGUEZ-PORCEL M, BENTLEY MD, RITMAN EL, LERMAN A, LERMAN LO, 2004. Cortical microvascular remodeling in the stenotic kidney: role of increased oxidative stress. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:1854-1859.

## 10 Publikationen

### Originalarbeit:

Alexander C. Langheinrich, Marian Kampschulte, **Franziska Scheiter**, Christian Dierkes, Philip Stieger, Rainer M Bohle, Wolfgang Weidner.

**Atherosclerosis, inflammation and lipoprotein glomerulopathy in kidneys of apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice.** BMC Nephrol. 2010; 11: 18.

### Abstract:

Alexander C. Langheinrich, Marian Kampschulte, **Franziska Scheiter**, Christian Dierkes, Philip Stieger, Rainer M Bohle, Wolfgang Weidner.

**Atherosclerosis, inflammation and lipoprotein glomerulopathy in kidneys of apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice.** Deutscher Röntgenkongress in Berlin, Mai 2010. (Vortrag).

## 11 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. A. C. Langheinrich für die Vergabe dieses interessanten Themas, die tolle Betreuung und dauerhafte Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ein Dankeschön richte ich auch an Dr. med. M. Kampschulte für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bei der Durchführung der Tierexperimente.

Frau Gunhild Martels aus der Abteilung für Diagnostische Radiologie danke ich für die Anfertigung der Mikro- und Nano-CT-Datensätze sowie für die Einarbeitung in das Bildanalyseprogramm ANALYZE®.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der Universitätsklinik Gießen für die histologische Aufarbeitung und die Hilfestellung bei der mikroskopischen Auswertung der Proben bedanken.

Ganz besonders dankbar bin ich meinem Mann, meiner Familie und meinen Freunden, dafür dass sie in der Zeit des Studiums und der Promotion immer für mich da gewesen sind, mich motiviert und unterstützt haben.